



Universidad Andrés Bello

Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

EFFECTO DE APLICACIONES DE CALCIO Y ÁCIDO GIBERÉLICO (EN PRECOSECHA) SOBRE LA FIRMEZA DE BAYA DE UVA DE MESA EN ETAPAS DE DESARROLLO, COSECHA Y POSTCOSECHA.

Tesis presentado como parte de los requisitos para optar al grado de
Magíster en Biotecnología.

Profesor patrocinante

Dr. Reinaldo Campos Vargas
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Andrés Bello

Christofer Sebastián Jaque Vivanco

Santiago, Chile

Octubre, 2016



Universidad Andrés Bello

Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

EFFECTO DE APLICACIONES DE CALCIO Y ÁCIDO GIBERÉLICO (EN PRECOSECHA) SOBRE LA FIRMEZA DE BAYA DE UVA DE MESA EN ETAPAS DE DESARROLLO, COSECHA Y POSTCOSECHA.

Christofer Sebastián Jaque Vivanco

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Reinaldo Campos Vargas, en el laboratorio de Postcosecha del Centro de Biotecnología Vegetal, Universidad Andrés Bello, aprobado por los miembros de la Comisión de Evaluación, Dr. Bruno Defilippi y el Dr. Claudio Meneses.

Dr. Reinaldo Campos Vargas
Director de tesis

Dr. Bruno Defilippi
Miembro de Comisión

Dr. Claudio Meneses
Miembro de Comisión

Santiago, Chile
Octubre 2016.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todo el centro de biotecnología vegetal por la ayuda en el trabajo realizado durante esta tesis, principalmente al laboratorio de postcosecha por la ayuda en los trabajos de fenotipado, enseñanza de técnicas utilizadas y el *feedback* en la discusión de cada experimento. Agradecer a cada uno de mis compañeros, Pablo, Pato, Troy, Francisca, Jocelyn, Tamara, Baltasar, Iván y Cristóbal por escucharme cuando se les necesito y apoyarme durante toda esta etapa haciendo que el ambiente de trabajo sea agradable y reconfortante. Mención especial a aquellos más cercanos que más que compañeros de trabajo se han transformado en amigos aconsejando y escuchando cuando uno lo requiere. Además agradecer a aquellos que fueron pasando por el laboratorio, como Joaquín (Pelao) con el cual comenzamos juntos este proceso, fue ayuda, amigo y apoyo permanente dentro del trabajo. Agradezco a amigos externos al trabajo como Matías, Maite, Aref, Vero y Ángela. Con la mayoría comenzamos juntos el camino dentro de esta carrera y luego cada uno siguió su propia aventura, apoyando siempre cuando se les necesitó. Agradezco también a Carolina (Hermana) por estar presente en todo momento desde el comienzo hasta el fin de esta tesis apoyándome y dando alegrías. A toda la familia De Monte Cáceres que siempre me apoyó y aunque en este momento no estén presentes fueron una segunda familia que me acogió en momentos difíciles dentro de este proceso. Mención especial a mi familia, mi padre, madre, hermanos y cuñada por estar en cada momento, por levantarme en las etapas más duras que vivimos durante estos últimos años y tener fe en mí. Por último agradecer a mis tíos Rodrigo y Carmen, mis segundos padres en todo momento, por el cariño indispensable y confiar siempre en mis capacidades. Agradecer finalmente a todos aquellos que fueron parte y permitieron la realización de este trabajo como investigadores del INIA La Platina, del Centro de Biotecnología Vegetal, comisión de tesis y al profesor tutor de mi tesis, el Dr. Reinaldo Campos.

Financiamiento

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Postcosecha de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Andrés Bello y fue financiada por el proyecto FONDECYT N°1110406.

Índice

1. Resumen.....	7
1.1. Abstract.....	8
2. Introducción.....	9
2.1. Formulación del Marco Teórico.....	9
2.2. Hipótesis.	15
2.3. Objetivo general.....	15
2.4. Objetivos Específicos.....	15
3. Materiales y Métodos.	16
3.1. Material Biológico.	16
3.2. Tratamientos y Diseño Experimental.....	16
3.3. Muestreos.	17
3.4. Evaluación Fenotípica (Objetivo 1).....	18
3.5. Determinación de la Composición y Estructura de Pared Celular (Objetivo 2).	19
3.5.1. Residuos Insolubles en Alcohol (AIR).	19
3.5.2. Medición de Ácidos Urónicos Totales.	19
3.5.3. Preparación de portaobjetos para inmunohistoquímica.	20
3.5.4. Preparación de muestras biológicas para inmunohistoquímica.....	20
3.5.5. Inmunohistoquímica.	21
3.5.6. Extracción de pectinas y hemicelulosas.	24
3.5.7. Cuantificación de azúcares totales.	24
3.5.8. Dot Blot.....	25
3.6. Análisis comparativo de expresión mediante qRT-PCR (Objetivo 3).....	26
3.6.1. Extracción de ARN y síntesis de ADNc.	26
3.6.2. Selección de genes, diseño de partidores y PCR cuantitativo (qRT-PCR).....	28
4. Resultados.	30
4.1. Evaluación fenotípica de bayas de uva de mesa (Objetivo 1).	30
4.2. Composición y Estructura de Pared Celular (Objetivo 2).....	33
4.2.1. Cuantificación de Ácidos Urónicos Totales.	33
4.2.2. Inmunohistoquímica.	34
4.2.3. Medición de azúcares totales.	37

4.2.4. Dot blot.....	39
4.3. Análisis comparativo de expresión mediante qRT-PCR (Objetivo 3).....	42
5. Discusión.....	45
5.1. Evaluación Fenotípica.....	45
5.2. Determinación de la Composición y Estructura de Pared Celular.....	47
5.3. Análisis comparativo de expresión mediante qRT-PCR.	51
6. Conclusiones y Proyecciones.	54
7. Referencias.	55
8. Anexo.....	63

1. Resumen.

La uva de mesa representa aproximadamente un tercio de la exportación total frutícola de Chile. Thompson Seedless es una de las principales variedades exportadas por nuestro país. Dada su importancia económica es muy relevante una alta calidad del fruto para satisfacer a los consumidores. Dentro de los parámetros de calidad que más se ven afectados en cosecha y postcosecha, la disminución en la firmeza de baya es uno de los cambios más relevantes. Por este motivo estudiar los mecanismos que están involucrados en la modificación de la firmeza resulta de gran interés.

La disminución de la firmeza de bayas de uva de mesa es el resultado de procesos que ocurren tempranamente en su desarrollo, debido en forma importante a un desensamble de la pared celular, el cual continúa después de haber sido cosechada.

Aplicaciones foliares de ácido giberélico (GA_3) son utilizadas principalmente para mejorar el tamaño de las bayas. Sin embargo, se ha reportado un aumento en firmeza con este tratamiento. Asimismo, el uso de aspersiones de calcio (Ca^{+2}) son empleadas normalmente para producir un incremento en la firmeza de bayas. Dado lo anterior el objetivo de este trabajo fue realizar un estudio del efecto de tratamientos con Ca^{+2} y GA_3 sobre la firmeza de bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless en etapas de precosecha, cosecha y postcosecha.

Mediante análisis fenotípico se obtuvo que el tratamiento con Ca^{+2} no presentó un efecto significativo en firmeza. Por otro lado las aplicaciones con GA_3 fue el tratamiento que generó bayas más firmes en cosecha y postcosecha. Ensayos de inmunohistoquímica revelaron que existió un remodelamiento de la pared celular referido a hemicelulosas desde punta hasta cosecha. Además, la cuantificación de ácidos urónicos dejó en evidencia un desensamble de la matriz de pectinas. Por otro lado, análisis de la acumulación de transcritos de genes involucrados en el remodelamiento de la pared celular, indicaron que los patrones de expresión de PG, XET y PME se correlacionaron con el ablandamiento durante el desarrollo de las bayas. Estos resultados contribuyen con información respecto al efecto de aplicaciones de

Ca⁺² y GA₃ sobre la firmeza en bayas de uva de mesa durante el desarrollo, cosecha y postcosecha.

1.1. Abstract.

Table grapes represents about one third of the total fruit exports of Chile. Thompson Seedless is one of the most important varieties exported by our country. Because of its economic importance is relevant a high quality of fruit to satisfy consumers. The quality parameters that are most affected in harvest and postharvest is a decrease in the firmness. Actually this is one of the most important changes. For this reason, the study of the mechanisms that are involved in firmness modifications are of great interest.

The decrease in firmness of table grape berries is the result of processes occurring in early development, due significantly to a cell wall disassembly, which continues after being harvested.

Foliar applications of gibberellic acid (GA₃) are used primarily to increase berry size. However, it has been reported a rise in firmness using this treatment. Also, the use of calcium (Ca⁺²) sprays treatments are regularly used to increase berry firmness. Under this perspective, the aim of this work was the study of the effect of Ca⁺² and GA₃ treatments in the firmness of table grape berries cv. Thompson Seedless in the stages of preharvest, harvest and postharvest.

Phenotypic analysis indicated that treatment using Ca⁺² did not show a significant effect on firmness. However, applications using GA₃ resulted in firmer berries in harvest and postharvest than control. Immunohistochemical assays revealed that there was a remodeling of the cell wall pointing to hemicelluloses from veraison to harvest. Additionally, uronic acid quantitation suggests a disassembly of the matrix pectins. Furthermore, analysis of transcript accumulation of genes involved in cell wall remodeling indicated that expression patterns of PG, PME and XET were correlated with the softening across the berry development. These results provided information regarding the effect of Ca⁺² and GA₃ applications on firmness of table grape berries during development, harvest and postharvest.

2. Introducción.

2.1. Formulación del Marco Teórico.

La uva de mesa es de gran importancia económica para nuestro país, ya que representa aproximadamente un tercio de la exportación frutícola, siendo ésta la segunda fuente de ingreso más importante de Chile. En el 2015 se exportaron 732.637 toneladas de uva de mesa, donde el cultivar Thompson Seedless corresponde a una de las principales variedades exportadas de nuestro país (www.odepa.gob.cl, 2015).

Los principales destinos de exportación de la uva de mesa en Chile son países del hemisferio norte, donde EE.UU, Europa y Asia son los mayores consumidores de uva de mesa chilena. Debido a que las distancias para que la uva chilena llegue a manos del consumidor son muy considerables, es de gran importancia que el fruto mantenga sus parámetros de calidad en óptimas condiciones para ser aceptado en los mercados destinos. Esto se ha transformado en un problema para la industria ya que debido a los largos tiempos de viaje (21 días EE.UU, 30 días Europa y 45 días Asia) la uva de mesa sufre cambios tanto en textura, apariencia y sabor, cambios que son percibidos de mala manera por parte de los consumidores. Por estas razones, es importante estudiar los cambios fisiológicos que se producen en la baya durante su desarrollo y almacenamiento a bajas temperaturas por tiempos prolongados, y de esta manera generar estrategias para poder obtener una mejor vida de postcosecha y una mayor calidad de esta fruta.

Dentro de los parámetros de calidad que más se ven afectados en el almacenamiento durante el transporte, el ablandamiento o disminución en la firmeza de las bayas es uno de los cambios más importantes. La firmeza, una de las características de calidad más destacada por los consumidores, la cual sufre variables cambios durante las diferentes etapas del crecimiento de las bayas. El desarrollo de la baya de uva de mesa se caracteriza por tener un patrón doble sigmoideo (Coombe y McCarthy, 2000; Yakushiji *et al.*, 2001) separado en tres etapas. La primera, se caracteriza principalmente por que las bayas son firmes y de color verde, existe una gran acumulación de ácidos mientras que el contenido de azúcares es relativamente bajo. Durante este período, el

crecimiento de las bayas es rápido y ocurre principalmente por división y elongación celular (Dokoozlian, 2000a). La segunda etapa se destaca por un lento crecimiento y ocurre el proceso denominado pinta, envero o veraison, caracterizado generalmente por el cambio de color de la baya, por ser el punto de inflexión en las curvas de contenido de azúcar y acidez y además comienza el ablandamiento (Coombe y Hale, 1973). En la tercera etapa de desarrollo se produce la pérdida de firmeza de la baya en conjunto con un incremento en el tamaño basado principalmente en expansión celular (Dokoozlian, 2000a ; Harris *et al.*, 1968).

Las principales estrategias utilizadas por productores para mejorar la calidad de la uva de mesa son aplicaciones de fertilizantes y reguladores de crecimiento en las primeras etapas de desarrollo. Dentro de estas, el ácido giberélico (GA₃), un diterpeno pentacíclico que principalmente promueve la elongación y división celular (Lara, 2013), es usado comúnmente en variedades de uva de mesa sin semilla (apirénicas) durante etapas tempranas (3 a 4 mm de diámetro) para aumentar el tamaño de las bayas siendo capaz de producir un incremento de aproximadamente un 50% del tamaño (Dokoozlian, 2000b). Además, el GA₃ se ha relacionado con la regulación del ciclo y expansión celular cuando es aplicado en etapas tempranas del desarrollo (Zoffoli *et al.*, 2009), lo que hace que aplicaciones de GA₃ sean de importancia comercial para productores de uva de mesa, en particular de las sin semilla (seedless). Por otro lado, existen estudios donde se refieren al efecto que tendría el GA₃ sobre la firmeza en bayas de uva, donde en la variedad Thompson seedless han demostrado tener un efecto positivo en firmeza (Marzouk y Kassem, 2011; Singh *et al.*, 1978). Sin embargo, el mecanismo específico que explicaría la influencia de esta hormona sobre el aumento de la firmeza en los frutos no ha sido estudiado y se mantiene aún desconocido. Solo se ha relacionado el efecto de GA₃ con la inducción de actividad de enzimas relacionadas al remodelamiento de pared celular y expansión celular (Thomas *et al.*, 2005).

Otra práctica común, es la aplicación de calcio tanto foliar como en suelo en las primeras etapas de desarrollo de la baya, desde cuaja hasta pinta, cuando la re-translocación de calcio se puede producir vía xilema usando la vía de

evapotranspiración (White y Broadley, 2003). Se ha descrito que el uso de aplicaciones de calcio genera fruta de mejor calidad postcosecha (Marzouk y Kassem, 2011) lo que además se ha correlacionado con un mayor grado de control de la pudrición gris generada por *Botrytis cinerea* durante la vida de postcosecha (Ciccarese *et al.*, 2013). Asimismo, se ha mencionado que aplicaciones de calcio en uva de mesa generan bayas más grandes, más turgentes y con mayor firmeza al momento de la cosecha en comparación a plantas no tratadas (Bonomelli y Ruiz, 2010). Sin embargo, luego de almacenar en frío la fruta (simulando el tiempo de exportación) este efecto desaparece (Bonomelli y Ruiz, 2010). Otros estudios, han demostrado que aplicaciones de calcio durante precosecha en bayas de uva de mesa generan un incremento en la firmeza en etapas de cosecha y durante postcosecha (Al-Obeed, 2011; Marozuk y Kassem, 2011). Sin embargo, también se ha reportado un efecto nulo de las aplicaciones de calcio en precosecha, desde cuaja hasta pinta no incidiendo en firmeza durante cosecha ni almacenamiento en frío (Du Plessis, 2008). Debido a esta inconsistencia en los resultados, es difícil concluir si aplicaciones exógenas de calcio son realmente útiles para mejorar el parámetro de firmeza, por lo que estudios que aporten más información sobre el efecto de este tipo de aplicaciones en bayas de uva de mesa son de gran interés. Por otra parte, el mecanismo por el cual las aplicaciones exógenas de calcio contribuirían a un aumento de la firmeza y a la reducción del ablandamiento en postcosecha de la baya no se encuentra elucidado.

El calcio es uno de los nutrientes esenciales de las plantas, este catión divalente es requerido para múltiples procesos biológicos. En la pared celular cumple una función estructural, mientras que en la vacuola es utilizado como contra catión para aniones orgánicos e inorgánicos. Además, en el citosol tiene el rol de segundo mensajero, siendo capaz de modular respuestas en múltiples vías de señalización (White y Broadley, 2003). Estructuralmente, juega un rol importante en la estabilización de la pared celular, debido a las fuertes interacciones con los grupos carboxílicos de los ácidos pécticos. Estas interacciones conforman lo que se conoce como modelo de "caja de huevos" compuesta principalmente por la unión del calcio a las cadenas desmetiladas de homogalacturonanos mediante enlaces iónicos proporcionando una mayor rigidez y estabilidad en la pared celular (Bonghi *et al.*, 2009; Braccini *et al.*, 1999;

Grant *et al.*, 1973). En las plantas el calcio es absorbido desde el suelo por las raíces y es transportado vía xilema mediante evapotranspiración hacia el resto de los tejidos en crecimiento, lo que ocurre por apoplasto, mediante espacio intercelular (White y Broadley, 2003).

La disminución de firmeza en los frutos durante el ablandamiento se ha relacionado fuertemente con un desensamble de la pared celular, donde enzimas involucradas en depolimerización de pectinas y hemicelulosas son fundamentales para este proceso. Pectin-metilesterasa (PME), poligalacturonasa (PG) y pectato liasa (PL) son algunas de las enzimas relacionadas principalmente en desensamble de pectinas. Estos carbohidratos estructurales corresponden principalmente a los homogalacturonanos que son sintetizados y secretados con un alto grado de metil-esterificación que disminuye durante el desarrollo debido a la acción de PME, capaz de remover grupos metilos del carbono 6 de residuos de ácido galacturónico de las cadenas de homogalacturonanos (Brummell y Harpster, 2001). Los azúcares desmetilados son el sustrato de otras enzimas remodeladoras de pared, como PG y PL. PG es capaz de catalizar la hidrólisis de ácido galacturónico (Brummell y Harpster, 2001), mientras que PL también cataliza el corte de ácidos galacturónicos pero mediante β -eliminación (Brühlmann, 1995; Marín-Rodríguez, 2002). Un aumento de la actividad de PG, ha sido asociado al ablandamiento durante el desarrollo de bayas de uva vinífera cv. Sauvignon blanc (Cabanne y Donèche, 2001), en uva de mesa cv. Thompson Seedless también se ha observado un aumento en la actividad de esta enzima durante el ablandamiento de las bayas (Balic *et al.*, 2012). Con respecto a PL, se ha descrito un aumento en los niveles de transcritos del gen que codifica para esta enzima posterior a pinta, durante el comienzo del ablandamiento, situación que a medida que se acerca a cosecha disminuye, asociándolo con una reducción en firmeza de la baya (Nunan *et al.*, 2001). Por otra parte, un estudio en uva vinífera demostró que polimorfismos en el gen de PL han sido vinculado a parámetros relacionados con textura de la baya (Vargas *et al.*, 2013). En relación a hemicelulosas, se han descrito varios frutos donde la depolimerización de este polisacárido está correlacionado con ablandamiento de estos, siendo el caso de arándanos (Vicente *et al.*, 2007b), palta (Odonoghue y Huber, 1992) y tomate (Sakurai y Nevins, 1993). En este último, la masa molecular de

hemicelulosa se vio reducida en un 50% al comparar un tomate inmaduro (verde) versus uno maduro (rojo), asociando esta disminución a una degradación de xiloglucano, que junto con la solubilización de pectinas contribuyen significativamente al ablandamiento del tomate (Sakurai y Nevins, 1993). Dentro de las enzimas involucradas en el remodelamiento de la hemicelulosa, se puede mencionar la xiloglucano endotransglicosidasa (XET), la que es capaz de catalizar el corte y re-ligación de moléculas de xiloglucano (Brummell y Harpster, 2001; Rose y Bennett, 1999). En bayas de uva *Vitis labruscana* cv. Kyoho un aumento en los niveles de transcrito de esta enzima desde pinta hasta cosecha se han asociado a la inducción del ablandamiento (Ishimaru y Kobayashi, 2002). Resultados similares se han descrito en uva *Vitis vinifera* cv. Shiraz (Nunan *et al.*, 2001).

Dentro de las proteínas involucradas en remodelamiento de hemicelulosa, existe grupo denominado expansinas (EXP). Estas, son proteínas que relajan la pared celular de manera dependiente a pH, mediante una interrupción reversible en los puentes de hidrógeno entre la microfibrilla de celulosa y la matriz de hemicelulosas (Brummell y Harpster, 2001; Cosgrove, 2000). En uva durante el desarrollo de las bayas, se ha encontrado cambios en niveles de expresión de esta proteína, mientras que en postcosecha la expresión de EXP se ve inducida por efecto de la deshidratación, indicando así un papel fundamental en pared celular durante la vida de postcosecha (Dal Santo *et al.*, 2013).

Análisis transcripcionales en uva han sido desarrollados con el fin de comprender de mejor manera la dinámica de las enzimas involucradas en remodelamiento de pared durante la maduración de la fruta. Con respecto a esto, se ha desarrollado un microarray Affymetrix que contiene aproximadamente 14.500 genes en base a resultados de análisis de expresión diferencial en *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon (Lund *et al.*, 2008). Con las nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento se han llevado a cabo estudios transcriptómicos mediante RNA-seq caracterizando por primera vez cambios asociados al desarrollo de bayas en *Vitis vinifera* “Corvina”, identificando marcadores de desarrollo expresados diferencialmente, variantes de

splicing y el descubrimiento de nuevas regiones de transcripción (Zenoni *et al.*, 2010). Sin embargo, debido al enfoque enológico de estos trabajos es difícil asociar datos transcriptómicos con fenotípicos asociados a firmeza en bayas de uva de mesa y almacenamiento en postcosecha.

Con el fin de entender los mecanismos fisiológicos y moleculares asociados a firmeza durante el desarrollo de la baya de uva de mesa y su almacenamiento en postcosecha, el objetivo de este trabajo es realizar un análisis fisiológico y molecular en bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless sometidas a tratamientos de aplicación exógena de calcio (CaCl_2) y ácido giberélico (GA_3) durante su desarrollo para identificar diferencias asociadas a firmeza y posibles genes asociados a este fenotipo.

2.2. Hipótesis.

La aplicación de calcio y ácido giberélico en primeras etapas de desarrollo (floración hasta pinta) inducen cambios en componentes de la pared celular que aumentan la firmeza de bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless.

2.3. Objetivo general.

Identificar cambios en la pared celular relacionados con diferencias de firmeza en bayas de uva de mesa cv. Thompson Seedless tratadas con calcio y ácido giberélico.

2.4. Objetivos Específicos.

1. Realizar un seguimiento fenotípico comparativo durante precosecha, cosecha y postcosecha de la uva de mesa cv. Thompson Seedless tratada con calcio y ácido giberélico en las primeras etapas de desarrollo.
2. Determinar los cambios que se producen en la composición de pared celular en uva de mesa variedad Thompson Seedless tratadas con calcio y ácido giberélico en sus primeras etapas de desarrollo mediante inmunohistoquímica y análisis bioquímico.
3. Analizar mediante qRT-PCR expresión de genes involucrados en remodelamiento de pared celular en bayas de uva de mesa variedad Thompson Seedless tratadas con calcio y ácido giberélico en etapas de desarrollo.

3. Materiales y Métodos.

3.1. Material Biológico.

El experimento se realizó en un parronal de uva de mesa cv. Thompson Seedless estilo español ubicado en Santiago, zona central de Chile (34°20S, 71°17W), en la temporada 2013-2014. Las plantas fueron manejadas de acuerdo a las prácticas utilizadas para producción comercial.

3.2. Tratamientos y Diseño Experimental.

Los tratamientos (Tabla 1) fueron asperjados durante la mañana directamente a los racimos hasta el punto de goteo a una distancia aproximada de 20 cm mediante una bomba de espalda. Las soluciones fueron preparadas en el momento y las aplicaciones se realizaron entre el período de floración y pinta. A todos los tratamientos se les adicionó 0,01 % v/v del surfactante Silwet L-70 para mejorar la absorción de las soluciones en las bayas. Después de cosecha los racimos fueron almacenados a 0 °C durante 30 días, posteriormente, como simulación del tiempo de venta (*shelf-life*), éstos fueron mantenidos por 48 h a temperatura ambiente.

Tabla N°1. Tratamientos, concentración y frecuencia en que fueron aplicados a uva de mesa cv. Thompson Seedles entre floración y pinta.

Tratamiento	Producto	Concentración	Frecuencia aplicación
1	H ₂ O	-	Cada 6 días. 10 aplicaciones
2	GA ₃	40 ppm	Cada 6 días 3 aplicaciones
3	CaCl ₂	1% p/v	Cada 7 días 10 aplicaciones
4	GA ₃ y CaCl ₂	40 ppm y 1% p/v	Similar a tratamientos 2 y 3

3.3. Muestreos.

Se tomaron cinco racimos de cada planta pertenecientes a tratamientos con calcio, ácido giberélico (GA₃), combinación (Ca y GA₃) y agua (H₂O). Estos fueron analizados desde pinta hasta cosecha y en cada punto las bayas se seleccionaron según contenido de azúcares (índice flotabilidad). Esto se llevó a cabo con el fin de que todas las bayas se encuentren en el mismo estadio fisiológico de acuerdo a la relación que existe entre °Brix y densidad como método no invasivo de fenotipado (Fournand *et al.*, 2006; Rolle *et al.*, 2011). Al momento de cosecha se utilizaron tres racimos de cada tratamiento, un racimo para analizar a la cosecha y los dos restantes fueron almacenados a 0°C durante 30 días. Uno de estos fue analizado en la salida de frío mientras que el otro se analizó luego de 2 días a 20° C (*shelf-life*).

El fenotipado fue realizado al momento en que las muestras fueron llevadas desde el campo al laboratorio. Una vez analizadas o almacenadas según corresponda fueron congeladas con nitrógeno líquido y guardadas a -80 °C para análisis posteriores.

3.4. Evaluación Fenotípica (Objetivo 1).

Se realizó una evaluación fenotípica de una población representativa de bayas pertenecientes a cada punto de muestreo, de acuerdo a la medición de los siguientes parámetros:

- **Firmeza del fruto:** Se evaluó utilizando el equipo TextureAnalyser (TA-XTplus, Stable Micro Systems, UK), expresando la firmeza como fuerza (N mm^{-1}) o como deformación (mm) mediante la utilización de una sonda de 2 mm de diámetro para determinación de firmeza de baya total.

- **Sólidos solubles:** Se realizó su determinación mediante la utilización de un refractómetro termo-compensado digital (HI 96811, Hanna Instruments Inc., EE.UU.) donde los resultados fueron expresados en grados Brix ($^{\circ}\text{Brix}$).

- **Acidez titulable:** Fue determinada mediante la titulación de 5 mL de jugo de uva provenientes de la maceración manual de una población representativa de bayas pertenecientes a cada grupo de muestras. La titulación se realizó con NaOH 0,1 N hasta un pH cercano a 8,2 registrando el volumen y expresando la acidez como porcentaje de ácido tartárico.

- **Diámetro:** Se determinó el diámetro ecuatorial de las bayas con un pie de metro digital en todos los tratamientos y puntos de muestreo.

- **Peso:** Se determinó mediante la utilización de una balanza digital en todos los tratamientos y puntos de muestreo.

3.5. Determinación de la Composición y Estructura de Pared Celular (Objetivo 2).

3.5.1. Residuos Insolubles en Alcohol (AIR).

A partir de las muestras previamente congeladas y almacenadas a -80 °C provenientes de cada tratamiento y punto de muestreo se realizó una extracción de componentes de pared celular. Para esto se pesaron 10 g de uva y fueron molidas en mortero con etanol 95%, posterior a esto se completó un volumen de 50 ml de etanol en vaso precipitado y se llevó a ebullición durante 10 min. Se homogenizó con ultra turrex (Tissue Tearor, 985370, Biospec Products Inc., EE.UU.) por 3 minutos y se centrifugó a 3000 x g durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante, se agregó 20 mL de etanol 95% y se centrifugó nuevamente a 3000 x g por 15 min. Se repitió el procedimiento 2 veces y se dejó secar 24h a 40°C (Saulnier y Thibault, 1987). El *pellet* seco obtenido finalmente se denominó AIR (*alcohol insoluble residue*).

3.5.2. Medición de Ácidos Urónicos Totales.

Para determinación de contenido de ácidos urónicos totales se tomaron 2 mg de residuos de AIR que fueron hidrolizados con 250 µl de TFA (ácido trifloro acético) 2M incubados a 100°C por 3 horas, agitando los tubos cada 15 - 20 min. Posterior a esto se evaporó el TFA en baño termo regulado a 100°C toda la noche bajo campana y se lavaron las muestras 2 veces con 300 µl de isopropanol 100%. El hidrolizado obtenido se suspendió en 200 µl de H₂O ultra pura y se sometió a sonicación durante 15 min. La suspensión se centrifugó a 10700 x g por 5 min y el sobrenadante fue utilizado para medir ácidos urónicos totales (Lefever *et al.*, 2004). La cuantificación de ácidos urónicos totales fue realizada según el método descrito por Blumenkrantz y Asboe-Hansen (1973) con algunas modificaciones. El sobrenadante obtenido previamente mediante la hidrólisis fue diluido 1/20 obteniendo un volumen final de 100 µl, luego se agregaron 600 µl de tetraborato de sodio (preparado en ácido sulfúrico) y 10 µl de ácido sulfámico 4M pH 1,6 para eliminar la interferencia de los azúcares neutros (Filisetti-Cozzi y Carpita.,1991). Se agitó mediante vortex y se incubó a 100°C por 5 min, luego fueron

enfriadas en hielo por 5 min. Posteriormente se agregó 10 µl de solución de *m*-hidroxidifenil 0,15 % (diluido en NaOH 0,5 %) se agitó y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Epoch, EE.UU.) a una longitud de onda de 520 nm. El blanco utilizado fue la misma muestra sometida a los mismos procedimientos pero no se agregó *m*-hidroxidifenil 0,15 %, solo NaOH 0,5 %N. La curva de calibración utilizada se obtuvo mediante la medición de ácido D-galacturónico en concentraciones de 0 a 200 µg/mL.

3.5.3. Preparación de portaobjetos para inmunohistoquímica.

Los portaobjetos utilizados para realizar la inmunohistoquímica fueron silanizados mediante el protocolo descrito por Nuovo (1992) con algunas modificaciones. Los portaobjetos fueron colocados en canastillos de plástico y sumergidos en distintas soluciones, comenzando 5 min en una solución de etanol 95% con 0,5% HCl agitando de vez en cuando. Luego se sumergieron 1 min en agua, 1 min en agua destilada, 1 min en acetona pura, 5 min en una solución 3-aminopropyltriethoxysilane 2% (silano 2%) en acetona pura y posteriormente se enjuagaron en acetona pura realizando 20 inmersiones. Los portaobjetos fueron secados rápidamente con aire caliente y dejado 24 horas a 60°C para su posterior uso en el fijado de muestras.

3.5.4. Preparación de muestras biológicas para inmunohistoquímica.

Durante el fenotipado realizado en todos los puntos de muestreo con cada tratamiento las bayas fueron cortadas de manera transversal y mantenidas en una solución fijadora (FAA) compuesta por 50 % etanol, 35 % dH₂O, 10 % formaldehído 5 % ácido acético glacial. Luego de que han sido fijadas las muestras y pasar un tiempo en esta solución son introducidas en *cassettes* con el objetivo de realizar cortes histológicos. Previo a los cortes, las muestras al interior del *cassette* debieron ser sometidas a un proceso de deshidratación lenta para posteriormente ser incluidas en una matriz de parafina. La

deshidratación consistió de un proceso de agitación en frío de las muestras en soluciones de etanol 10% y 30% durante 1 hora cada una, luego en etanol 50%, 70% y 85% por 2 horas cada una y etanol 95% toda la noche. Al día siguiente se agitaron en frío durante 2 horas en una solución de etanol 100%, luego fueron nuevamente agitadas en frío en soluciones con concentraciones crecientes de xilol/etanol; 30/70; 50/50; 70/30 (2 horas por solución). Posteriormente se mantuvieron 30 minutos con xilol 100 % (2 veces), 1 hora a 60 °C en xilol/parafina (1:1) y luego toda la noche a 60°C en parafina pura (Histosec®, Merck, Darmstadt, Alemania). Al día siguiente y para finalizar el proceso se cambiaron los *cassettes* a una nueva parafina pura y se dejaron 2 días a 60°C para posteriormente incluir el tejido en una matriz de parafina. Se realizaron cortes de 2 µm de espesor con un micrótopo Leica RM 2125 RT Leica byosystems (Nussloch, Baden-Württemberg, Alemania) y se fijaron en un portaobjeto de microscopio que fue previamente silanizado. Una vez fijada la muestra en el portaobjeto y previo a realizar la inmunohistoquímica se procedió al desparafinado y rehidratación de estas, que consistió en sumergir 2 veces por 5 min en soluciones: xilol 100%, etanol 90%, 80% y 70%, finalizando 5 min en agua destilada.

3.5.5. Inmunohistoquímica.

Se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para la determinación *in-situ* de las modificaciones de hemicelulosas y formación de puentes de calcio entre cadenas de homogalacturonanos a todos los tratamientos durante los diferentes puntos de muestreo. Para esto se utilizó un protocolo descrito por Christiaens *et al.*, (2011a), donde los cortes rehidratados fueron bloqueados con leche descremada (Svelty, Nestle) al 3 % p/v en un tampón fosfato salino (PBS, NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄·12H₂O 7,8 mM y KH₂PO₄ 1,5 mM pH 7,4) durante toda la noche a 4°C para bloquear las zonas donde el anticuerpo primario pueda unirse inespecíficamente. Luego fueron lavados 3 veces durante 5 min con PBS con agitación suave. Posteriormente fueron incubados durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario adecuado (Tabla 2). Los anticuerpos primarios fueron obtenidos de PlantProbes

(PlantProbes, Leeds, Reino Unido). Para eliminar el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 min cada uno con agitación suave, luego se incubaron durante 1,5 horas en oscuridad con un segundo anticuerpo IgG anti-rata acoplado a Alexa-Flúor 488 (Molecular Probes®, Invitrogen, CA, EE.UU.) (Tabla 2). A continuación se lavaron 3 veces por 5 min en PBS. Todos los cortes fueron incubados por 10 min en una solución del fluorocromo Calcofluor White M2R 100 µg/mL PBS (Fluorescent brightner 28, Sigma, Reino Unido). Para finalizar, se lavó el calcofluor con 3 lavados de PBS por 5 min y se montaron en un agente de anti-desvanecimiento (Microscopy Neo-Mount®, Merck, Darmstadt, Alemania).

Las imágenes de microscopía de fluorescencia confocal se obtuvieron utilizando un Intelligent Imaging Innovations Everest spinning-disk confocal system con un aumento 10X. Los parámetros de los laser tanto para LM15 como 2F4 fueron similares, utilizando Laser 405 (Dapi) 15% y Laser 488 (GFP) 48%. Los parámetros de exposición fueron los siguientes: LM15, Dapi = 223ms y GFP = 586ms; 2F4, Dapi = 213 ms GFP =425ms. Dos a tres células por imagen se procesaron con el programa Adobe Photoshop (Adobe Systems, Alemania). La inmunohistoquímica se llevó a cabo por duplicado en cada muestra.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en experimentos de inmunohistoquímica e inmunoblots (Dot blot).

Anticuerpo primario	Antígeno	Dilución anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Dilución anticuerpo secundario	Experimento utilizado	Referencia
LM 15	Motivo XXXG de cadena principal de xiloglucano.	1/10 en PBS leche 3 %	IgG anti-rata Alexa-Fluor (Molecular Probes®, Invitrogen)	1/1000 en PBS	Inmunohistoquímica y Dot Blot	Marcus <i>et al.</i> , 2008
2F4	Cadenas de HG unidos entre sí mediante puentes de calcio	1/100 en buffer (Tris HCl 20 mM pH 8,2; CaCl ₂ 0,5 M; NaCl 150 mM)	IgG anti-rata Alexa-Fluor (Molecular Probes®, Invitrogen)	1/50 en PBS	Inmunohistoquímica	Liners <i>et al.</i> , 1989
LM 19	Cadenas de HG con bloques desmetilados y bordes metilados	1/100 en TBS en leche 5 %	IgG anti-rata alkaline phosphatase (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1/10000 en TBS en leche 5 %	Dot Blot	Verhertbruggen <i>et al.</i> , 2009
LM 10	Cadenas de xilanos no sustituidos	1/500 en TBS en leche 5%	IgG anti-rata alkaline phosphatase (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1/10000 en TBS en leche 5%	Dot Blot	McCartney <i>et al.</i> , 2005

3.5.6. Extracción de pectinas y hemicelulosas.

Se realizó un fraccionamiento de pared celular a partir de residuos insolubles en alcohol (AIR) para obtener por separado diferentes componentes de la pared (pectinas y hemicelulosas). Para esto se pesaron 10 mg de AIR que fueron sometidos a agitación fuerte durante 2 horas en 800 µl de H₂O pura a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 13.400 rpm durante 5 min, se rescató el sobrenadante y este se guardó a 4°C obteniendo de esta manera la fracción péctica soluble en agua. Al *pellet* se le agregó 800 µl de solución de CDTA 50 mM en acetato de sodio 50 mM pH 6,5, utilizada para solubilizar todas las pectinas unidas por enlaces iónicos, se repitió el proceso con H₂O pura obteniendo la fracción péctica soluble en CDTA. Lo mismo se realizó con 800 µl de una solución de Na₂CO₃ utilizado para romper los enlaces covalentes entre pectinas obteniendo de esta forma la fracción péctica soluble en Na₂CO₃. Para las fracciones de hemicelulosa se realizó el mismo procedimiento que con las fracciones pécticas variando el tiempo de agitación. Para esto, al *pellet* se le agregó 800 µl de una solución de KOH 4% con NaBH₄ 0,02% y se dejó agitando lentamente toda la noche. Repitiendo el proceso anterior se obtuvo la fracción de hemicelulosa soluble en KOH 4%. Posteriormente se agregó el mismo volumen de KOH 24% con NaBH₄ 0,02% y se repitió el proceso utilizado anteriormente con KOH 4% dejando esta vez agitando durante todo el día obteniendo finalmente la fracción de hemicelulosa soluble en KOH 24% (Sun *et al.*, 2013; Redgwell *et al.*, 1988; Vicente *et al.*, 2007a).

3.5.7. Cuantificación de azúcares totales.

Se realizó la cuantificación de azúcares totales de acuerdo al protocolo descrito por Cárdenas-Coronel (2012) a todas las fracciones de pared celular obtenidas a partir de las muestras de cada tratamiento en todos los puntos de muestreo. Para esto se agregaron 50 µl de muestra en un tubo de 1,6 ml, luego se adicionaron 200 µl de H₂O pura y 500 µl de la solución de antrona (Dreywood, 1946) al 0,2% en H₂SO₄ concentrado protegiendo la solución siempre de la luz ya que es fotosensible. Posteriormente se agitó fuertemente la reacción usando vortex durante 30 seg y se

calentó durante 10 min a 100°C. Luego se enfrió rápidamente en hielo y se midió absorbancia en un espectrofotómetro (Epoch, EE.UU.) a una longitud de onda de 620 nm. La curva de calibración utilizada se obtuvo mediante la medición de glucosa en concentraciones de 0 a 600 µg/mL.

3.5.8. Dot Blot.

Se realizó un ensayo de inmunoblots a todas las fracciones de pared celular obtenidas a partir de todas las muestras de cada tratamiento en todos los puntos de muestreo. Para esto se adicionaron 2 µl de muestra de cada fracción y tratamiento en una membrana de nitrocelulosa, se dejó secando durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se bloqueó con leche descremada (Svelty, Nestle) al 5% en TBS 1X (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3 g Tris Base, pH 8.0) con agitación constante. Luego se eliminó la leche y se lavó durante 1 hora con TBS 1X, se eliminó el TBS 1X y se incubó con anticuerpo primario adecuado durante 1 hora a temperatura ambiente (Tabla 2). Los anticuerpos primarios fueron obtenidos de PlantProbes (Leeds, Reino Unido) como se mencionó en experimento previo de inmunohistoquímica, posteriormente se recuperó el anticuerpo primario, se lavó 3 veces durante 15 minutos con T-TBS 1X 0,05% (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3 g Tris Base, 0,05 % Tween 20 omnipur, pH 8.0) y 1 una vez por 15 minutos con TBS 1X. Se incubó durante 1 hora con anticuerpo secundario IgG anti-rata acoplado a fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, EE.UU.)(Tabla 2), se recuperó el anticuerpo secundario y se realizó el mismo procedimiento de lavado que con anticuerpo primario agregando un lavado más de 15 minutos en TBS 1X. Finalmente se realizó el revelado durante 5 minutos en agitación agregando 3 ml de NBT/BCIP (NBT-BCIP® solution, Sigma, Reino Unido). Luego se lavó rápidamente con TBS 1X y la membrana revelada fue escaneada. Posteriormente se cuantificó la intensidad de la señal mediante el análisis de imágenes con el software ImageJ 1.47v (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

3.6. Análisis comparativo de expresión mediante qRT-PCR (Objetivo 3).

En este objetivo se realizó una búsqueda y selección de genes candidatos involucrados en remodelación de pared celular. Se realizó un estudio de genes ortólogos de otras especies frutales que tengan relación con ablandamiento durante la maduración y además se hizo una búsqueda en el genoma de *Vitis vinífera* de aquellos genes que presenten una alta correlación con firmeza en pared celular de bayas. Para hacer más específica la búsqueda de genes candidatos se utilizó como referencia el resultado de una secuenciación de transcriptoma (RNA-seq) enmarcada en el Proyecto Fondecyt 1110406. Dicho análisis utilizó muestras de ARN extraídas de bayas de la variedad NN 107 sometida a tratamientos con y sin ácido giberélico en la temporada 2011-2012.

3.6.1. Extracción de ARN y síntesis de ADNc.

La extracción de ARN se realizó a bayas obtenidas en cada muestreo para todos los tratamientos. Se tomaron 5 bayas por cada réplica biológica, las que fueron molidas y homogenizadas en mortero con nitrógeno líquido. El aislamiento de ARN se realizó utilizando el método de borato caliente (Gudenschwager *et al.*, 2012) el cual necesita 3 g de tejido homogenizado congelado. Para esto se agregan 15 ml de buffer XT (borato de sodio decahidratado 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 1%, ácido desoxicólico 1 %) previamente calentado a 80°C, 0,3 g de polivinilpirrolidona (PVP), 150 µL de Nonidet-40 y 150 µL de 2-mercaptoetanol. Se homogenizó usando vortex durante 30 segundos, se incubó por 60 min a 42°C mezclando por inversión cada 15 min. Posteriormente se agregó 690 µl de KCl 3,5 M y se dejó en agitación constante en hielo durante 1 h. Luego se centrifugó a 12.000 x g a 4°C por 20 min para precipitar los restos celulares y se rescató el sobrenadante que fue dejado en un nuevo tubo. A este se le añadió un volumen (15 ml) de LiCl 4M, se mezcló mediante agitación suave y se dejó precipitando los ácidos nucleicos en hielo toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, posterior a la precipitación los tubos fueron centrifugados a 18.500 x g durante 50 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* obtenido se suspendió en 500 µl de agua DEPC (dietilpirocarbonato), se traspasó a tubos de microcentrífuga de

1,5 ml, se agregó 50 µl acetato de sodio 3M, 500 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó por vortex durante 30 segundos y se centrifugó a máxima velocidad por 5 min a 4 °C. La fase acuosa fue rescatada y colocada en otro tubo, luego se agregó 500 µl de agua DEPC a la fase orgánica y se procedió a centrifugar a máxima velocidad por 5 min a 4°C. Se rescató nuevamente la fase acuosa y fue colocada en el mismo tubo con la fase acuosa de la centrifugación realizada anteriormente. Los ácidos nucleicos de la fase acuosa obtenida son precipitados en hielo a 4 °C durante 1 hora con 30 µl de acetato de sodio 3,5 M y un volumen de isopropanol 100% a 4°C. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad a 4°C por 10 min, se eliminó el sobrenadante, el *pellet* fue lavado con 400 µl de etanol 80% en agua DEPC y se centrifugó nuevamente a máxima velocidad durante 10 min a 4°C. El ARN obtenido finalmente fue resuspendido en 30 µl de H₂O DEPC.

La integridad del ARN se verificó en geles de agarosa en condiciones denaturantes al 1,2% (p/v). La calidad y concentración de ARN se midió mediante el uso de un espectrofotómetro Nanodrop (Epoch, Biotek, EE.UU.) de acuerdo a los valores de absorbancia a 260 y 280 nm, donde la calidad mínima aceptada fue una relación 260/280 mayor a 1,8.

Para la síntesis de ADNc se tomó 1 µg de ARN que fue tratado con 1 µl de DNAsa I (Invitrogen, CA, EE.UU.) durante 45 min a 37°C para eliminar los restos de ADN genómico. Posterior a este tratamiento, se añadieron 2 µl de una mezcla comercial de dNTP's 10 mM cada uno (Kapa Biosystems, Cape Town, Sudáfrica) y 2 µL de oligodT (18 pb) 500 µg/mL (IDT, Coralville, IA, EE.UU.), se incubó a 65 °C por 5 min y luego a cada tubo se le añadió una mezcla de volumen final de 7 µL la cual contiene 4 µL de tampón "*First Strand*" (Invitrogen, CA, EE.UU.), 2µL DTT (Invitrogen, CA, EE.UU.) y 1 µL RNAsa OUT (Invitrogen, CA, EE.UU.), posteriormente se incubó a 42 °C por 2 min. Después se agregó 1 µl de transcriptasa reversa Super Script II (Invitrogen, CA, EE.UU.), además se deja un control negativo sin transcriptasa reversa y otro sólo con H₂O DEPC, y se incubó a 42°C por 50 min. Luego se sometió a 70 °C por 15 min y transcurrido este tiempo, el ADNc se guardó a -20 °C. Para verificar la síntesis de ADNc

y la total eliminación de ADN genómico se realizó un PCR convencional en donde los partidores utilizados fueron diseñados para amplificar una secuencia del gen calibrador factor de elongación I (FEI) de *Vitis vinífera* cuyo producto, de 100 pb, se verificó en un gel de agarosa 1,5% (Balic *et al.*, 2012).

3.6.2. Selección de genes, diseño de partidores y PCR cuantitativo (qRT-PCR).

La selección de genes candidatos involucrados en remodelación de pared celular se realizó en base a estudios anteriores (Barnavon *et al.*, 2001; Deluc *et al.*, 2007; Deytieux-Belleau *et al.*, 2008; Nunan *et al.*, 2001), y con el objetivo de hacer más específica la búsqueda de genes candidatos se utilizó el resultado de una secuenciación masiva de ARN mediante la plataforma de RNA-seq proporcionada por Illumina (Illumina Inc., CA, USA). Este experimento, enmarcado en el proyecto Fondecyt 1110406, se realizó en muestras de ARN extraídos en la temporada 2011-2012 pertenecientes un estadio de desarrollo cercano a cosecha de la variedad firme conocida como NN 107 sometida a tratamientos sin/con ácido giberélico.

Los partidores fueron diseñados utilizando el software disponible AmplifX 1.5.4 (<http://ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX>) seleccionando aquellos genes cuyos productos amplificados generan fragmentos de aproximadamente 100-150 pares de bases (Tabla 3) y que se encuentran en las uniones exón-exón. Además para verificar que el producto fuera único se utilizó la herramienta disponible primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en contra del genoma de *Vitis vinífera* obteniendo de esta forma partidores que amplifican un solo producto genómico.

PCR cuantitativos (qRT-PCR) se realizaron en placas de 96 pocillos utilizando el sistema Real-Time PCR Mx3000P (Stratagene, La Jolla, EE.UU.). Se utilizó Fast EvaGreen qRT-PCR MasterMix (Applied Biosystems, Hayward, CA, EE.UU.) para estudiar los cambios relativos en el perfil de expresión de ARN mensajero y para confirmar la pureza del producto amplificado se llevó a cabo un análisis de curva de *melting*. La eficiencia de cada uno de los partidores se determinó mediante la preparación de

diluciones seriadas de un producto de PCR de cada partidador (Pfaffl, 2001). El experimento se realizó con 3 réplicas biológicas por triplicado, en donde cada tubo contenía 100 ng de ADNc, 100 nM de partidores, la concentración de 1X de Fast Eva Green qRT-PCR Master Mix y agua libre de nucleasas con un volumen final de 10 µL por reacción. El gen normalizador o de expresión constitutiva elegido fue factor de elongación 1 (EF1) para el cual todos los valores de Ct fueron normalizados con respecto a este gen. La expresión relativa se expresó como veces de cambio donde las condiciones calibradoras se establecieron arbitrariamente como 1.

Tabla 3. Lista de genes de uva analizados por qRT-PCR. Se muestra la mejor homología encontrada en la base de datos de Genoscope 12X.

Nombre del gen	Genoma de Vitis Genoscope 12X	Partidores utilizados
<i>PG 1</i>	GSVIVG01033303001	F: TCGGTTATTGGAACAGGTGATG R: ATCCGAAACATGACGCTGTG
<i>PG 2</i>	GSVIVG01026985001	F: TCAACTCGCCTTCATGGAAC R: CAATGTAGCAGTCTTCAATCCTTG
<i>PL 12</i>	GSVIVG01016208001	F: TACGCCAAGGCTTCCAGTGT R: ATACGATACGCCCATGGAGTCA
<i>PME 2</i>	GSVIVG01028041001	F: CCAACTCCAGCACTACCAG R: TCGGTTGCCCTTGATGTAAG
<i>XET 30</i>	GSVIVG01013055001	F: TGGTTCGATCCAAGCAAGGAGT R: GCCATTGGCTTTGATGGGTAGT
<i>EXP 8</i>	GSVIVG01032681001	F: GCTGCAATCGTACCTGTGTC R: CCCCTTTATTGATACTGCCCTG

4. Resultados.

4.1. Evaluación fenotípica de bayas de uva de mesa (Objetivo 1).

Se realizó un análisis fisiológico y fenotípico de bayas de uva de mesa variedad Thompson Seedless en las etapas de desarrollo (pinta), cosecha y postcosecha que incluyo todos los tratamientos (Control; Ca; Ca + GA₃; GA₃). Los muestreos durante el desarrollo de las bayas correspondieron a pinta y 70 días post anthesis (dpa), el siguiente fue cosecha y posteriormente postcosecha (30 días a 0°C y 30 días a 0°C mas *shelf life*). Se realizó el seguimiento de parámetros fisiológicos como diámetro, peso, contenido de sólidos solubles (CSS) y acidez (Figura 1), donde se puede observar una tendencia general del aumento en peso y diámetro después del punto de pinta y que sigue hasta cosecha. Respecto a CSS, el comportamiento fue similar notando un aumento de este parámetro hasta cosecha. Un efecto inverso se observó con el parámetro de acidez, disminuyendo desde pinta hasta cosecha. Durante postcosecha se puede observar la mantención de cada uno de los parámetros fisiológicos evaluados desde cosecha hasta la salida de frio más *shelf life*. Dentro de los tratamientos se pudo observar que existe un mayor crecimiento en bayas tratadas con GA₃ donde el diámetro y peso de estas es significativamente mayor a las bayas que no recibieron tratamiento. Por otro lado, el CSS para el tratamiento en conjunto (Ca + GA₃), presentó menor contenido de solidos solubles en comparación el resto de las aplicaciones en etapas de desarrollo. En cosecha el tratamiento con GA₃ tuvo mayor CSS con respecto al control mientras que en postcosecha no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Para el parámetro de acidez los tratamientos con GA₃ presentaron menor porcentaje de ácido tartárico en pinta, cosecha y postcosecha con respecto al control (Figura 1).

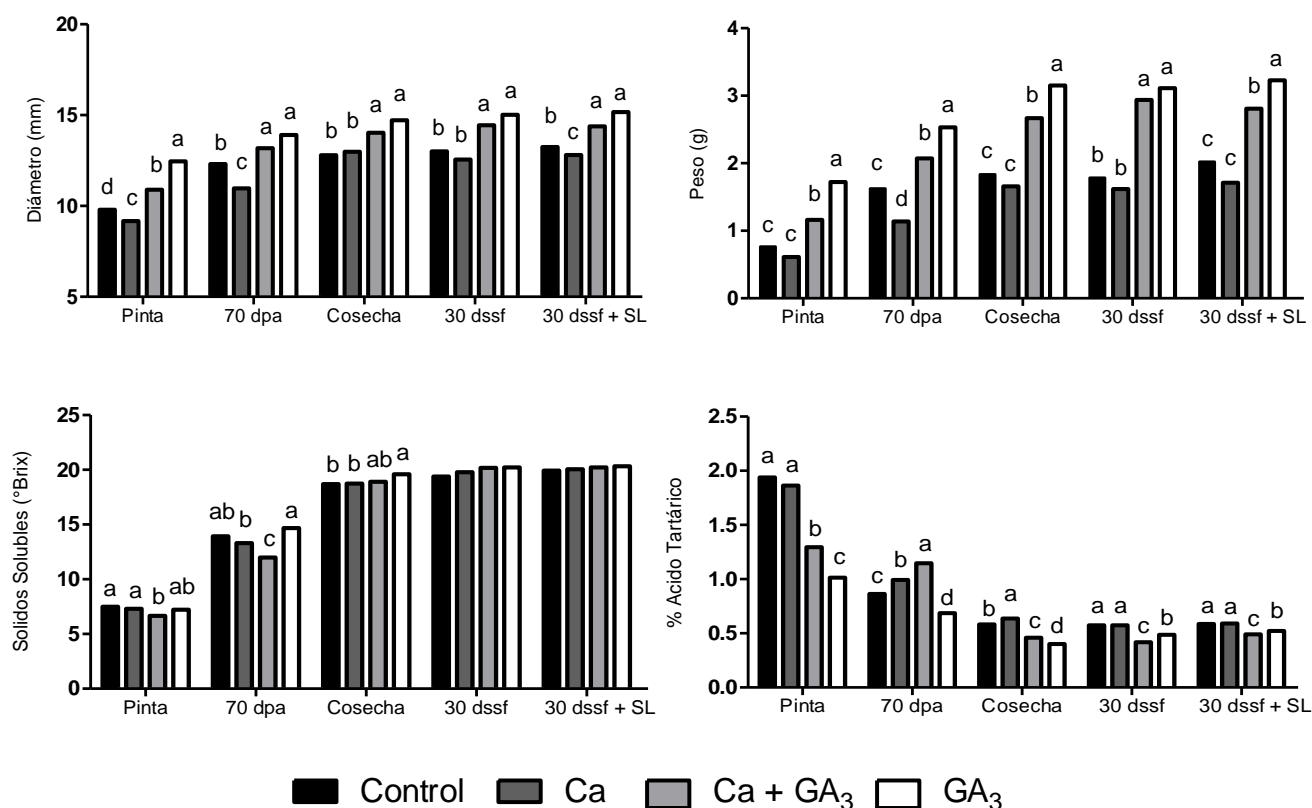


Figura 1. Parámetros fisiológicos a lo largo del desarrollo, durante cosecha y postcosecha. Cambios en diámetro, peso, contenido de sólidos solubles y acidez de bayas de uva de mesa variedad Thompson Seedless para los cuatro tratamientos estudiados ordenados desde pinta hasta cosecha, 30 días a 0°C (30 dssf) y 30 días a 0°C más *shelf life* (30 dssf + SL). Las letras simbolizan las diferencias estadísticas para cada tratamiento en un punto de muestreo, utilizando ANOVA y la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Ausencia de letras indican que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

Además se realizó el seguimiento de firmeza en todos los estadios estudiados utilizando los parámetros asociados a este fenotipo como fuerza máxima, trabajo, coeficiente de elasticidad y deformación (Figura S1). Con respecto a esto, solo se

seleccionaron los gráficos de coeficiente de elasticidad y deformación ya que fueron los que representaron de mejor forma el fenotipo de firmeza para los tratamientos aplicados (Figura 2). De acuerdo a esto, se pudo observar el ablandamiento producido por las bayas desde el período de pinta hasta cosecha y que se mantiene durante postcosecha. Los tratamientos aplicados también tuvieron un efecto sobre este parámetro. En etapas de precosecha las aplicaciones en conjunto de calcio y ácido giberélico muestran tener el mayor efecto en el aumento de firmeza con respecto al tratamiento control. Al momento de cosecha el tratamiento más firme resultó ser solo con ácido giberélico mientras que durante la salida de frío y el *shelf life* las bayas que fueron asperjadas con ácido giberélico (Ca + GA₃; GA₃) mostraron ser más firmes (Figura 2). Respecto a los tratamientos con calcio, no se observaron diferencias significativas respecto a las bayas control en ninguno de los parámetros de firmeza descritos en este trabajo.

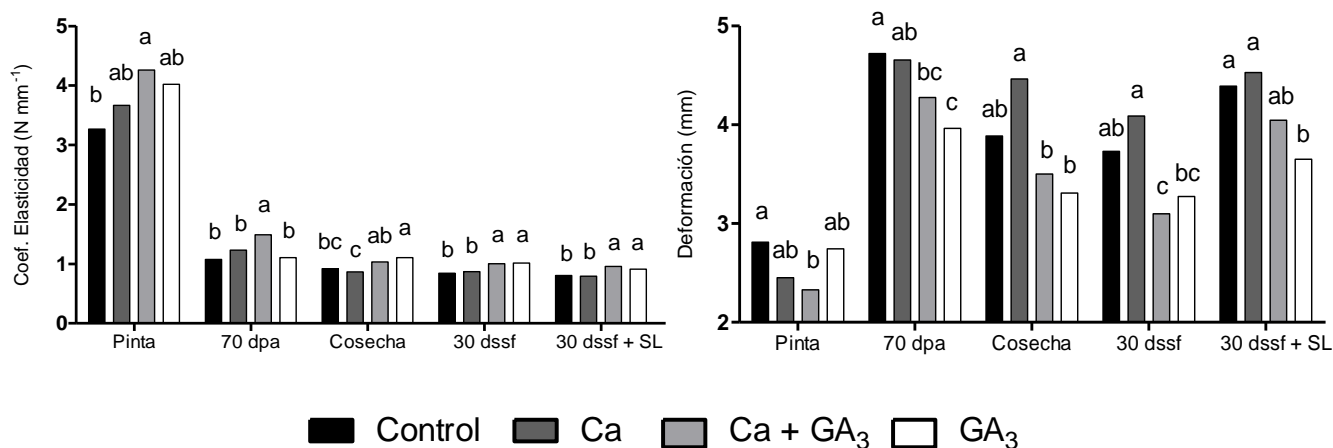


Figura 2. Firmeza de baya total expresada como coeficiente de elasticidad y deformación. Cambios en firmeza de bayas de uva de mesa variedad Thompson Seedless para los cuatro tratamientos estudiados ordenados desde pinta hasta cosecha, 30 días a 0°C (30 dssf) y 30 días a 0°C mas *shelf life* (30 dssf + SL). Las letras simbolizan las diferencias estadísticas para cada tratamiento en un punto de muestreo, utilizando ANOVA y la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

4.2. Composición y Estructura de Pared Celular (Objetivo 2).

4.2.1. Cuantificación de Ácidos Urónicos Totales.

Se realizó la cuantificación de ácidos urónicos presentes en la pared celular de bayas a partir de AIR. Este fue expresado como microgramos de ácidos urónicos por miligramo de AIR. Durante el desarrollo de las bayas se determinó una disminución en el contenido de ácidos urónicos hasta que llegan a cosecha y que luego se mantiene igual durante postcosecha. Con respecto a los tratamientos, en pinta se pudo observar una menor cantidad de ácidos urónicos en bayas con aplicaciones de ácido giberélico en comparación al tratamiento control, que se revierte durante desarrollo y postcosecha (Figura 3).

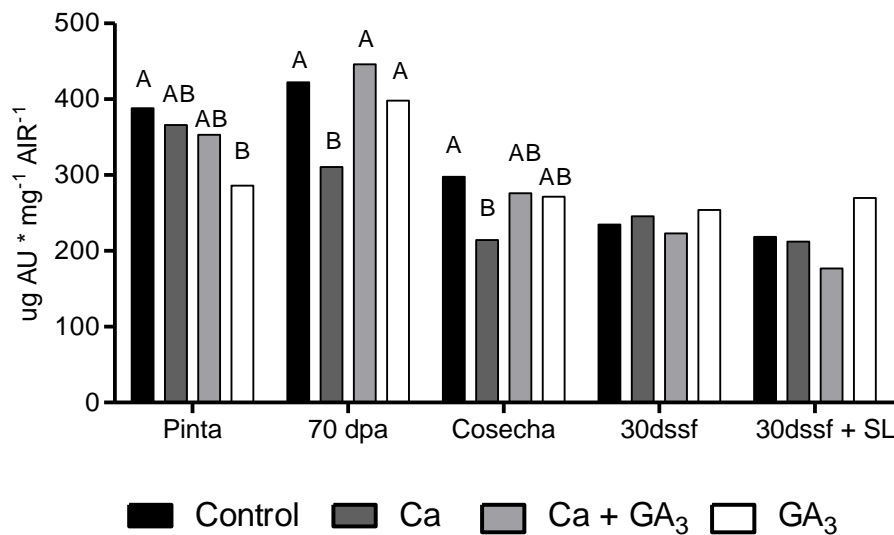


Figura 3. Contenido de ácidos urónicos. Concentración de ácidos urónicos expresado por miligramos de AIR. Las letras simbolizan las diferencias estadísticas para cada tratamiento en un punto de muestreo, utilizando ANOVA y la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Ausencia de letras indican que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

4.2.2. Inmunohistoquímica.

Para la determinación *in-situ* de las modificaciones de hemicelulosas y formación de puentes de calcio entre cadenas de homogalacturonanos se realizó un ensayo de inmunohistoquímica. Este se realizó utilizando anticuerpos específicos para componentes de la pared celular (LM15 y 2F4). El anticuerpo 2F4, reconoce la presencia de estructuras tipo caja de huevos entre homogalacturonanos a causa de enlaces iónicos de calcio. Con respecto a este anticuerpo, solo se pudo observar reconocimiento en zonas donde se encuentran los vértices de unión célula-célula (lamela media) para todos los tratamientos durante todos los estadios estudiados (Figura 4). Por otro lado, el anticuerpo LM15, que reconoce el motivo XXXG de la cadena de xiloglucanos de hemicelulosas, se pudo observar una mayor intensidad de señal en el primer punto de muestreo (Pinta), que luego disminuye durante el desarrollo, cosecha y postcosecha. Los tratamientos aplicados no tuvieron diferencias en la señal de este anticuerpo en ningún punto de muestreo (Figura 5).

2F4

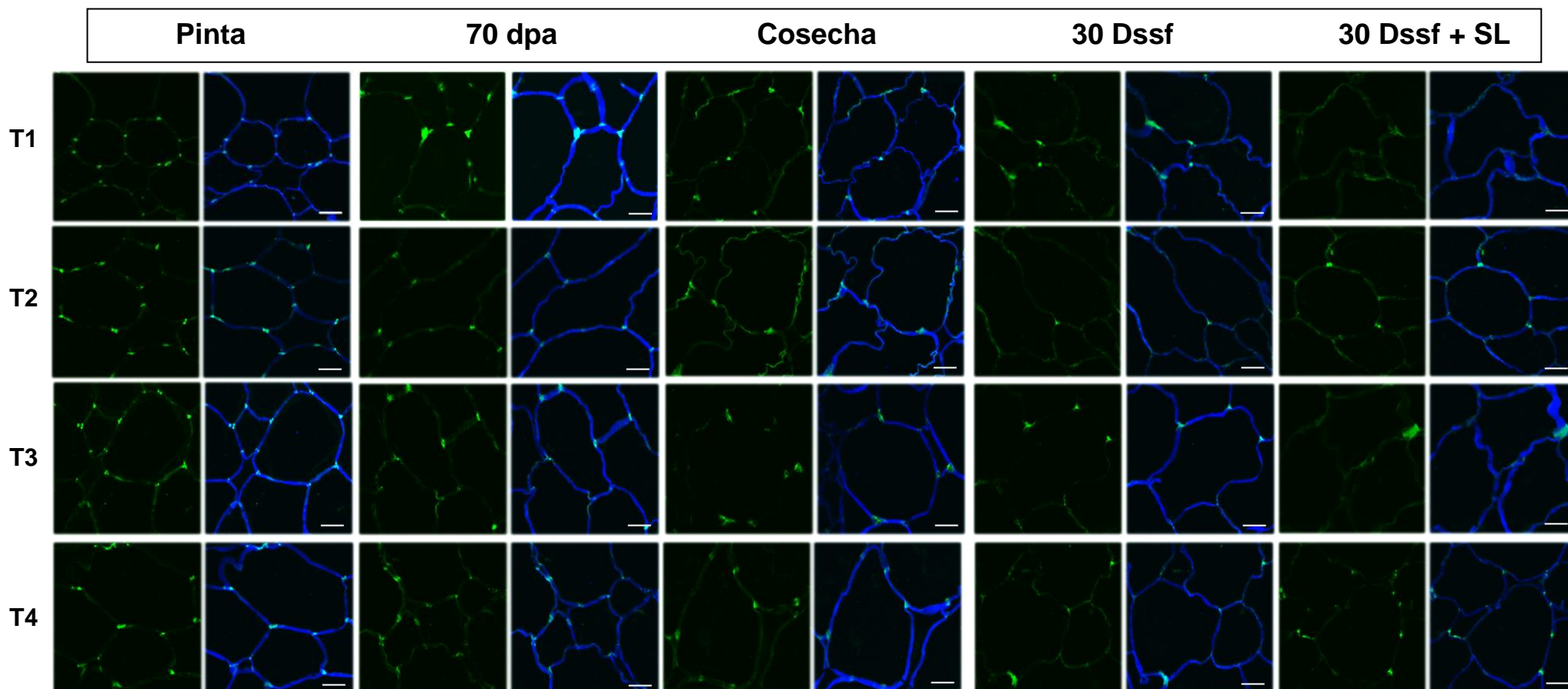


Figura 4. Inmunohistoquímica para tejido de mesocarpio de bayas. El anticuerpo utilizado 2F4. Imágenes corresponden a una sección representativa del tejido en las etapas de desarrollo para los tratamientos T1: Control; T2: CaCl_2 1%; T3: CaCl_2 1% + GA_3 y T4: GA_3 . La variabilidad de la forma y las dimensiones celulares son inherentes a zonas del mesocarpio sin tejido vascular. La barra representa 20 μm .

LM15

Pinta

70 dpa

Cosecha

30 Dssf

30 Dssf + SL

T1

T2

T3

T4

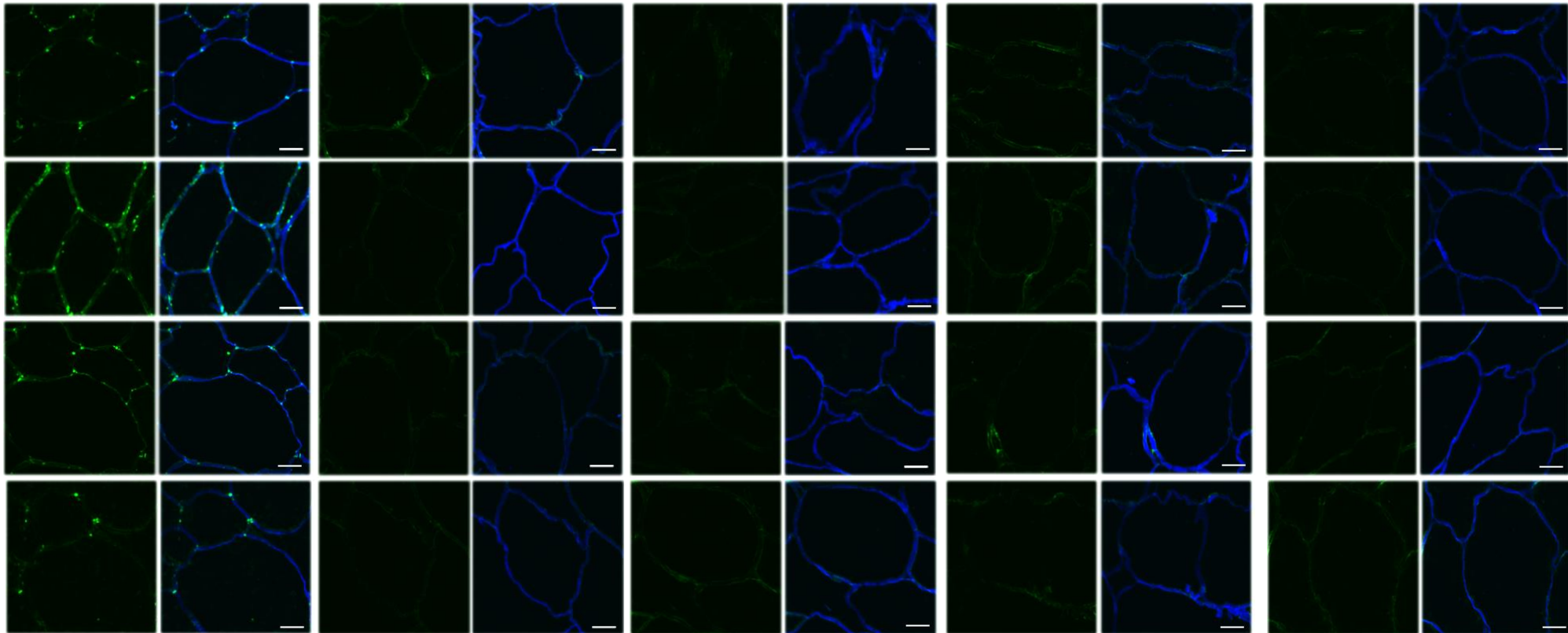


Figura 5. Inmunohistoquímica para tejido de mesocarpio de bayas. El anticuerpo utilizado LM15. Imágenes corresponden a una sección representativa del tejido en las etapas de desarrollo para los tratamientos T1: Control; T2: CaCl_2 1%; T3: CaCl_2 1% + GA_3 y T4: GA_3 . La variabilidad de la forma y las dimensiones celulares son inherentes a zonas del mesocarpio sin tejido vascular. La barra representa 20 μm .

4.2.3. Medición de azúcares totales.

Se realizó la medición de azúcares totales presente en pared celular de bayas de uva de mesa a partir de fracciones pécticas (H_2O , CDTA y Na_2CO_3) y de hemicelulosa (KOH 4% y KOH 24%) utilizando una curva de calibración de glucosa expresando los resultados como miligramos de glucosa por miligramo de AIR (Figura 6).

La medición de azúcares totales en la fracción soluble en H_2O presentó un patrón similar durante el desarrollo, cosecha y postcosecha. No obstante el tratamiento con GA_3 registró un aumento significativo en los puntos de muestreo previo a la cosecha y la salida de frío comparado con tratamiento control (Figura 6). Para las fracciones CDTA y Na_2CO_3 se pudo observar una tendencia similar entre ellas, donde existe un mayor contenido de azúcares totales en pinta que disminuye durante el desarrollo y que se mantiene en cosecha y postcosecha. Con respecto a los tratamientos, estos tuvieron diferente comportamiento, en donde los racimos solo con calcio presentaron menor contenido de azúcares totales durante cosecha con respecto al control, mientras que racimos con aplicaciones solo de ácido giberélico presentaron mayor contenido de azúcares durante el *shelf life* con respecto a los otros tratamientos (Figura 6). Las fracciones de hemicelulosa (KOH 4% y KOH 24%) también mostraron una tendencia similar entre ellas, donde se pudo observar mayor contenido de azúcares totales en pinta que disminuyen durante el desarrollo de las bayas, se mantienen hasta cosecha y durante postcosecha. Para la fracción KOH 24%, los racimos sin tratamiento (control) presentaron mayor contenido de azúcares en comparación al resto de las aplicaciones en cosecha, que se mantiene solo durante la salida de frío (Figura 6).

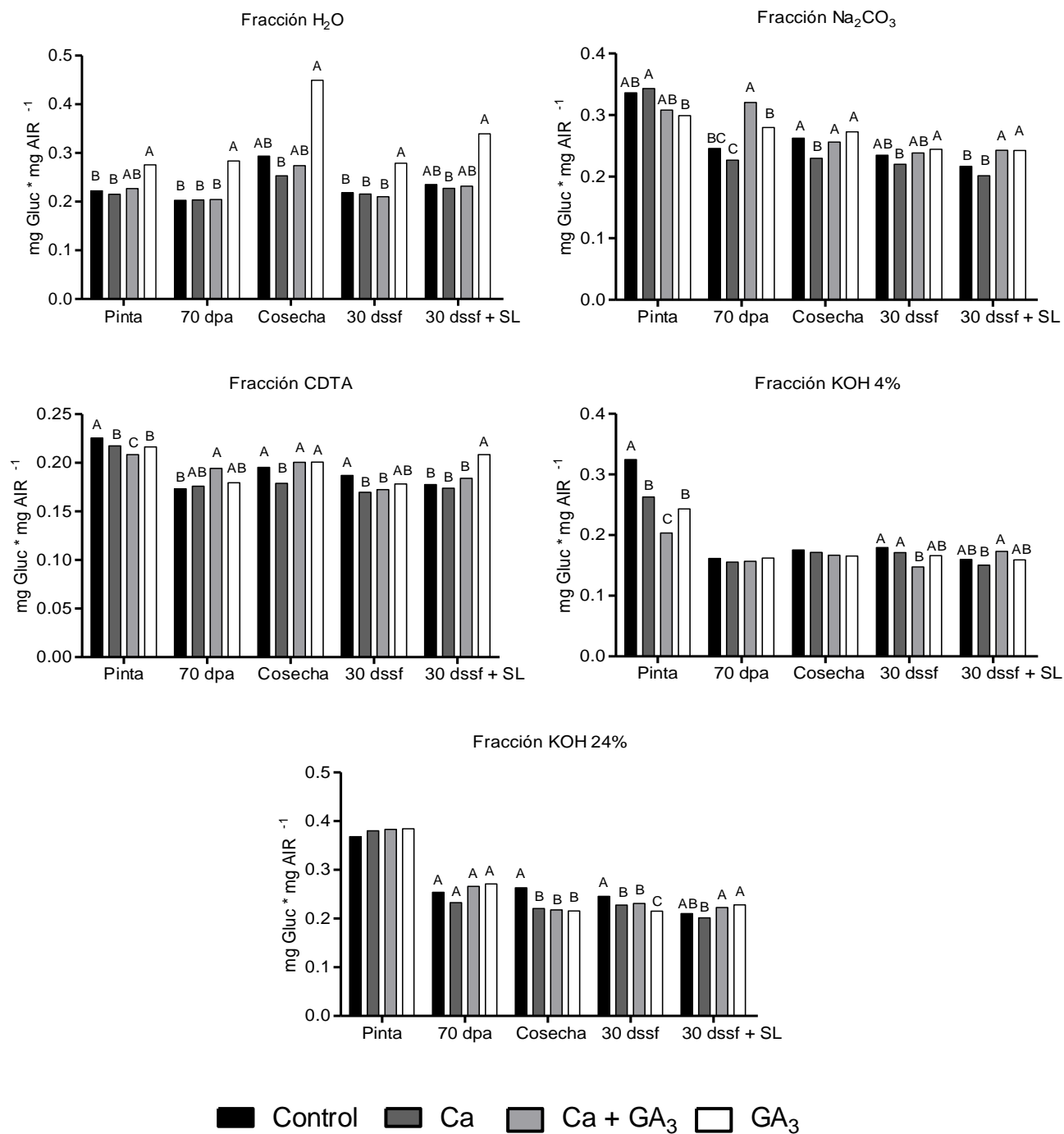


Figura 6. Contenido de azúcares totales. Concentración de azúcares totales expresado por miligramos de AIR. Las letras simbolizan las diferencias estadísticas para cada tratamiento en un punto de muestreo, utilizando ANOVA y la prueba de

Tukey ($p < 0,05$). Ausencia de letras indican que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

4.2.4. Dot blot.

Se realizó análisis de inmunoblots (*dot blots*) a todas las fracciones de pared celular de bayas de uva de mesa previamente realizadas en el punto 3.5.6., utilizando anticuerpos específicos que reconocen pectinas y hemicelulosas (Tabla 2). En la figura 7 se observan los resultados de *dot blots* realizados en el punto de cosecha con las marcas de cada anticuerpo previo a el análisis de imágenes, además se puede observar al lado derecho el resultado posterior al análisis de imágenes de los mismos *dot blots*. LM19 mostró tener mayor marca en fracciones de Na_2CO_3 , KOH 4% y KOH 24%. Para LM15 se pudo apreciar reducción de señal para los tratamientos con calcio con respecto al GA_3 y control en la fracción con KOH 24%. En el caso de LM10 se pudo apreciar un aumento en la intensidad de marca en la fracción con KOH 24% donde ningún tratamiento tuvo diferencias significativas (Figura 7).

Para los tres anticuerpos utilizados se realizó el análisis de imagen en la fracción más abundante para cada uno de ellos en todos los momentos de muestreo (Figura 8). En LM19 se analizó la fracción de Na_2CO_3 mientras que para LM15 y LM10 se utilizó la fracción KOH24%. En el caso de LM 19, solo presentó diferencias significativas en pinta, donde el tratamiento solo con GA_3 mostro mayor señal con respecto al control. Como se mencionó anteriormente, LM15 tuvo diferencias significativas entre tratamientos solo en cosecha donde tratamientos con calcio presentaron menor marca con respecto a los otros tratamientos. Por último, LM 10 tuvo diferencias significativas solo durante postcosecha, donde tratamientos con GA_3 tuvieron menor señal con respecto al control solo en salida de frio (Figura 8).

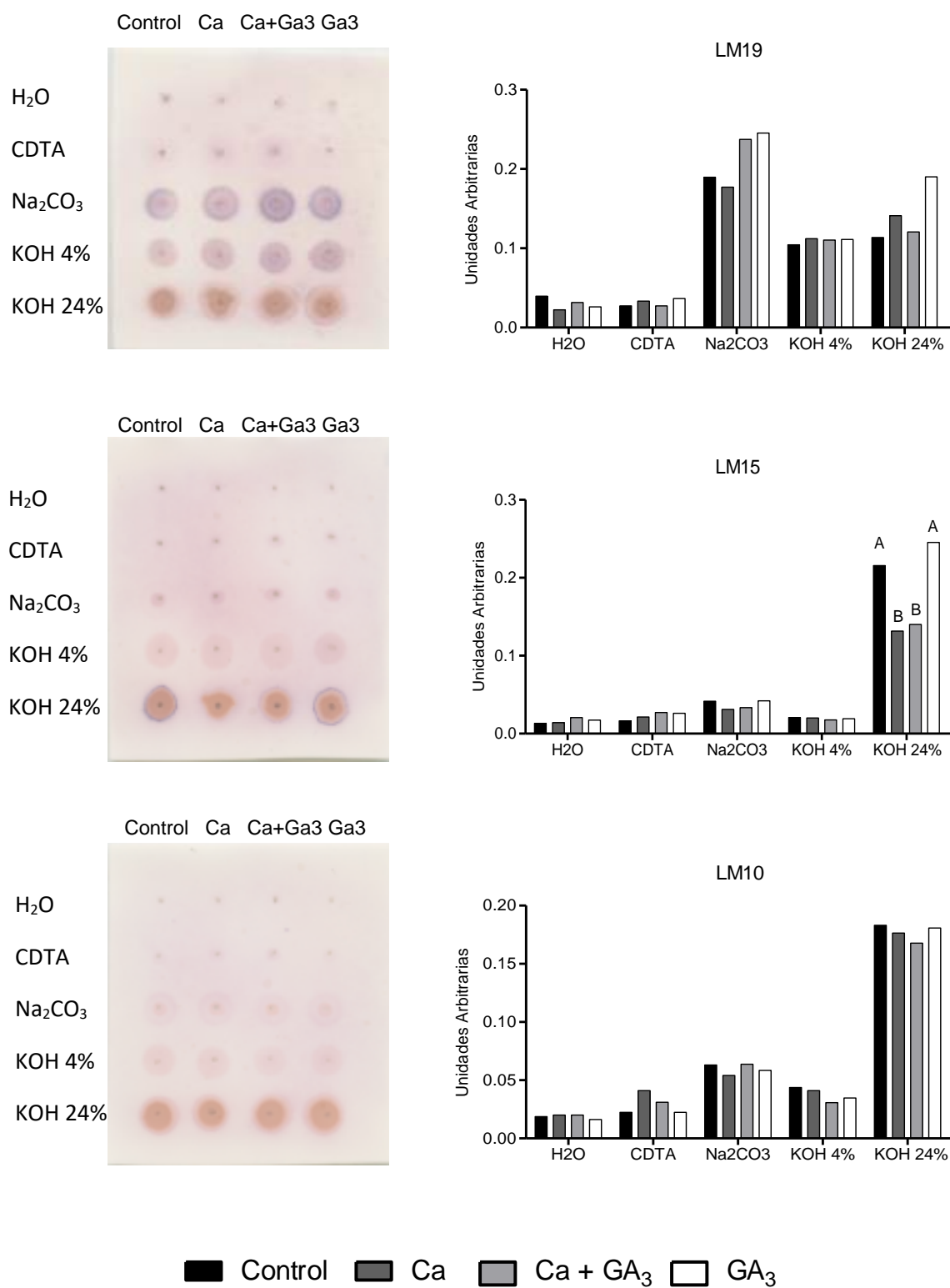


Figura 7. Cuantificación mediante ImageJ de *dot blots*. Cuantificación de *dot blots* para los anticuerpos LM19, LM15 y LM10 realizado a todas las fracciones de pared

celular de bayas de uva de mesa en el punto de muestreo de cosecha para todos los tratamientos. Los *dot blots* se observan a la izquierda con su respectivo análisis de imágenes mediante ImageJ a la derecha. Las letras simbolizan las diferencias estadísticas para cada tratamiento en una fracción determinada, utilizando ANOVA y la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Ausencia de letras indican que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

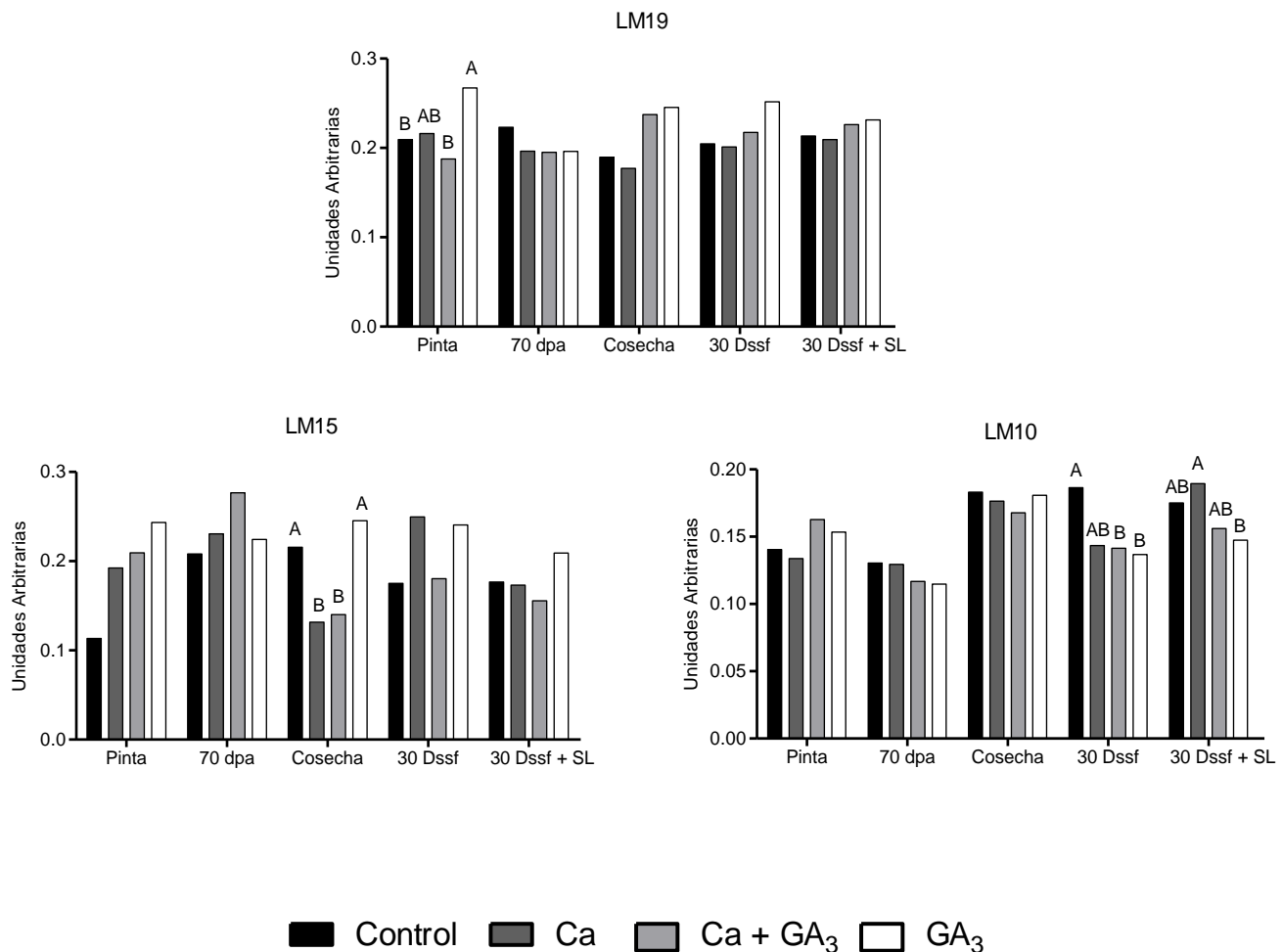


Figura 8. Cuantificación mediante ImageJ de *dot blots* a fracciones más representativas. Cuantificación de *dot blots* mediante ImageJ para los anticuerpos LM19, LM15 y LM10 realizado a las fracciones de pared celular de bayas de uva de mesa más abundantes para cada anticuerpo (Na_2CO_3 para anticuerpo LM19; KOH 24% para anticuerpos LM15 y LM10.). Se realizó a todos los puntos de muestreo y para

todos los tratamientos. Las letras simbolizan las diferencias estadísticas para cada tratamiento en un punto de muestreo, utilizando ANOVA y la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Ausencia de letras indican que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

4.3. Análisis comparativo de expresión mediante qRT-PCR (Objetivo 3).

El análisis de acumulación de transcrito de genes que codifican para enzimas relacionadas con remodelamiento de pectinas y hemicelulosas fue realizado mediante qRT-PCR en todos los tratamientos y para todos los puntos de muestreo (figura 9). Para el estudio de todos los genes evaluados, se utilizó como condición calibradora el estadio correspondiente a pinta asignándole el valor 1 de expresión relativa en todos los tratamientos. Los genes evaluados relacionados con el remodelamiento de pectinas correspondieron a poligalacturonasa (PG), donde se analizaron dos isoformas diferentes de este gen asignándoles nombres PG1 y PG2, pectin metilesterasa (PME) y pectato liasa (PL); asimismo se estudiaron los que están involucrados al remodelamiento de hemicelulosas como expansina (EXP) y xiloglucan endotransglicosidasa (XET) (Figura 9). Se puede apreciar que PG 1 tiene una tendencia al aumento posterior a pinta en todos los tratamientos. Con respecto a estos, no se observan diferencias significativas en ningún tratamiento. Para PG 2 los niveles de transcritos disminuyen después de pinta manteniéndose bajos durante cosecha y postcosecha. A los 70 dpa se observó un mayor nivel de expresión en el tratamiento solo con GA₃ con respecto al resto de las aplicaciones y al control, mientras que en cosecha las aplicaciones de Ca, GA₃ y combinación de ambos, mostraron menor acumulación de transcritos con respecto al control. PL y PME tienen una tendencia similar en los niveles de acumulación de transcritos durante los periodos estudiados, donde se observa una disminución de ARN mensajero desde pinta a cosecha que continúa durante postcosecha. Con respecto al efecto de los tratamientos, no se observaron diferencias significativas durante precosecha, mientras que en cosecha, en PL se pudo apreciar una menor acumulación de transcritos en el tratamiento solo con ácido giberélico. En postcosecha no hubo diferencias significativas entre los tratamientos aplicados con respecto al control (Figura 9). XET presentó un aumento en la expresión a medida que avanza el desarrollo de la baya hasta cosecha que se

mantuvieron en la postcosecha. Los tratamientos aplicados no fueron significativamente diferentes durante el desarrollo, mientras que en cosecha, el tratamiento en conjunto de Ca y GA₃ presentó mayor acumulación de transcritos para este gen con respecto al control. Por otra parte en postcosecha, particularmente en salida de frío el tratamiento con GA₃ mostro un aumento significativo en los niveles de transcritos con respecto al control. Para EXP no existe diferencias significativas entre tratamientos en ningún punto de muestreo y se pudo observar una disminución de la acumulación de transcritos en cosecha, que aumenta en la postcosecha (30 dssf + SL) (Figura 9).

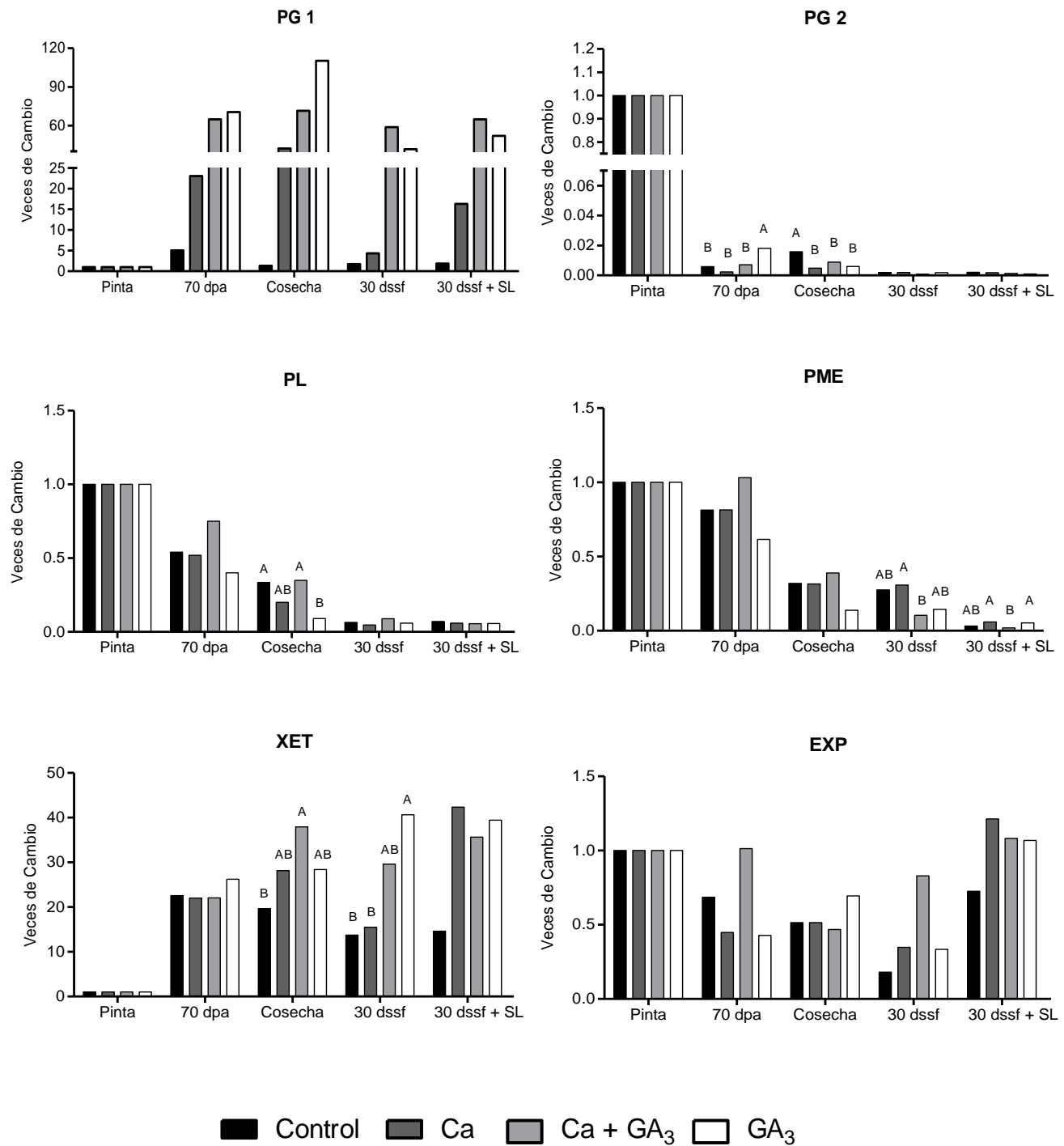


Figura 9. Perfil de acumulación de transcrito para genes involucrados en remodelamiento de pared celular durante el desarrollo, cosecha y postcosecha.

Expresión relativa para genes de remodelamiento de pared celular, expresado como veces de cambio. La condición calibradora fue pinta para cada uno de los tratamientos. Las letras simbolizan las diferencias estadísticas de los tratamientos en un punto de muestreo, utilizando ANOVA y la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Ausencia de letras indican que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

5. Discusión.

5.1. Evaluación Fenotípica.

Con el objeto de evaluar los cambios fenotípicos de aplicaciones de calcio y ácido giberélico, mediante aspersión en períodos entre floración y pinta a bayas de uva de mesa, se realizó el seguimiento de estas durante desarrollo, cosecha y postcosecha. Además, se orientó la investigación a obtener evidencia experimental de la acción de los tratamientos mencionados sobre características de la baya de uva, de manera de contrastar con la información publicada, que en términos generales resulta inconsistente (Bonomelli y Ruiz, 2010; Du Plessis, 2008; Marzouk y Kassem, 2011).

Con respecto a los parámetros fisiológicos, el peso y diámetro de las bayas tuvo un crecimiento desde pinta hasta cosecha (Figura 1), el cual se habría producido principalmente por expansión celular (Dokoozlian, 2000a), donde los tratamientos con GA₃ obtuvieron diámetro y peso de baya significativamente mayor al tratamiento control. Este crecimiento de las bayas con aplicaciones de GA₃ ha sido reportado en estudios previos (Marzouk y Kassem, 2011; Zoffoli *et al.*, 2009), donde se ha utilizado esta hormona en variedades de uvas sin semilla para aumentar el tamaño de estas. Durante postcosecha estos parámetros se mantienen igual a cosecha lo que reflejaría un almacenamiento en condiciones adecuadas (Figura 1). Por otro lado, el contenido de sólidos solubles presentó un aumento desde pinta hasta cosecha que se mantiene

durante postcosecha, relacionándose en forma opuesta con el contenido de acidez (Figura 1). Esta alza del contenido de sólidos solubles y reducción de la acidez ha sido reportada como un proceso normal en baya de uva que ocurre durante la tercera etapa de crecimiento desde pinta hasta cosecha (Dokoozlian, 2000a).

El tratamiento de CA + GA₃ produjo un efecto de disminución en el contenido de sólidos solubles durante precosecha que se tradujo en un retraso en la maduración de 7 días comparado con el control en cosecha, que también se presentó en el tratamiento solo con GA₃. Esto se evidencio puesto que los muestreos se realizaron durante el desarrollo en base a un periodo fijo de tiempo mientras que la cosecha fue realizada según el contenido de sólidos solubles (18°brix). Este efecto de retraso ya ha sido reportado en otros estudios asociados a aplicaciones de GA₃ (Ben-Arie *et al.*, 1997; Retamales *et al.*, 1994; Zoffoli *et al.*, 2009). Por otro lado, para la acidez se pudo observar que los tratamientos con GA₃ tuvieron menor porcentaje de ácido tartárico en comparación al control durante pinta, cosecha y postcosecha. Sin embargo, no se ha reportado un efecto directo de esta hormona con respecto al contenido de ácidos orgánicos en la baya de uva, pero de acuerdo a estos resultados se podría atribuir esta disminución a un efecto del tratamiento aplicado.

En relación a los cambios observados en firmeza, se observa la disminución de este parámetro desde pinta hasta cosecha en todos los tratamientos aplicados, que se relaciona con el ablandamiento producido por el desarrollo normal de las bayas después de pinta (Nunan *et al.*, 1998; Yakushiji *et al.*, 2001) (Figura 2). En cuanto a los tratamientos aplicados, se pudo observar que aplicaciones de calcio no tuvieron un efecto significativo en comparación al control durante ningún punto de muestreo, desde pinta hasta postcosecha (Figura 2), que concuerda con resultados obtenidos en Bonomelli y Ruiz (2010) donde no hubo efecto positivo en firmeza cuando las bayas fueron asperjadas con calcio durante precosecha en parrones de la variedad Thompson Seedless, relacionando esta falta de efecto en firmeza a la cantidad de mecanismos fisiológicos en los que este elemento estaría participando en la planta (Bonomelli y Ruiz, 2010). Las aplicaciones de GA₃ en cambio sí tuvieron un efecto positivo en

firmeza durante todos los puntos de muestreo, destacándose principalmente en postcosecha (Figura 2). Durante precosecha, aplicaciones en conjunto de calcio con GA₃ muestran un mayor efecto en firmeza, que se complementa con un menor ablandamiento, que durante postcosecha se mantiene, obteniendo bayas más firmes con respecto al control. Por otro lado, el tratamiento solo con GA₃ resultó ser más firme durante postcosecha con respecto al control y aplicaciones de Ca (Figura 2). No hay antecedentes que indiquen un aumento en firmeza durante precosecha y postcosecha en bayas de uva de mesa con aplicaciones de GA₃, pero si existen estudios en donde aplicaciones de GA₃ generan un aumento en firmeza a la cosecha (Marzouk y Kassem, 2011). Poco se sabe de los mecanismos biológicos por lo cual esta hormona estaría generando este efecto en firmeza, pero se relaciona al efecto que esta tiene en el aumento de división y expansión celular, generando de esta forma mayor densidad del tejido celular (Thomas *et al.*, 2005). Además, la fuerte relación que tiene el efecto de esta hormona con enzimas y proteínas relacionadas principalmente a modificación de hemicelulosas en la primera etapa de desarrollo de la baya de uva, como xiloglucan endotransglucosidasa (XET) y expansina (EXP) que aumentan sus niveles de transcritos en este periodo asociándose este cambio a una relajación de la pared celular durante el alargamiento de las bayas producto de expansión celular (Chai *et al.*, 2014).

Adicionalmente, GA₃ está relacionado con la capacidad de promover la plasticidad de la pared celular, seguido de la hidrólisis de almidón en azúcares que reducen el potencial de agua de la célula, resultando en la entrada de agua a la célula generando elongación (Marzouk y Kassem, 2011). Por lo cual el aumento en firmeza en tratamientos en conjunto de calcio con GA₃ podría ser asociado principalmente al efecto del GA₃, ya que aplicaciones de calcio no tuvieron efecto positivo en firmeza mientras que aplicaciones de GA₃ si generó un fenotipo más firme en la mayoría de los puntos de muestreo (Figura 2).

5.2. Determinación de la Composición y Estructura de Pared Celular.

Para poder entender de qué manera las aplicaciones de calcio y GA₃ estarían realizando cambios en la pared celular se realizó la cuantificación del contenido de

ácidos urónicos. Estos corresponden a los polisacáridos estructurales más abundantes en las pectinas, ya que son parte de la cadena principal de homogalacturonanos que en uva abarcan aproximadamente el 80% de las pectinas presentes en la pared celular (Vidal *et al.*, 2001). Con respecto a esto, el contenido de ácidos úronicos mostró una disminución desde pinta hasta cosecha que se correlacionó con la disminución de firmeza que ocurre entre estos estadios (Figura 3), situación descrita en otras publicaciones (Nunan *et al.*, 1998; Yakushiji *et al.*, 2001), en donde a medida que la baya avanza en su maduración el contenido de ácidos urónicos disminuye. Con respecto a los tratamientos aplicados, solo GA₃ en pinta indujo una menor cantidad de ácidos urónicos comparado con el control. Mientras que a 70 dpa y cosecha el tratamiento con calcio mostró una disminución significativa para el contenido de ácidos urónicos con respecto al control que no se correlacionó con la firmeza (Figura 3). Por otro lado, los tratamientos no mostraron diferencias significativas para el contenido de ácidos urónicos durante postcosecha por lo que no se pueden atribuir los cambios en firmeza asociados al contenido de ácidos urónicos durante estas etapas. Lo cual indicaría que existen otros componentes que no han sido estudiados en este trabajo que podrían estar actuando en la obtención fenotipo.

Con respecto a los cambios estructurales de la pared celular durante el desarrollo y postcosecha se realizó un ensayo de inmunohistoquímica, utilizando dos anticuerpos relacionados principalmente a pectinas y hemicelulosa (2F4 y LM15). Para el anticuerpo 2F4 (Figura 4) que se une específicamente a las interacciones iónicas de calcio con cadenas de homogalacturonanos, no se observaron diferencias en la intensidad de marca ni en el patrón entre tratamientos aplicados. Con respecto a los puntos de muestreo, durante el desarrollo, desde pinta hasta cosecha, el patrón de marca y la intensidad se mantuvieron mientras que en postcosecha se observó una disminución del patrón de señal solo en el tratamiento control del estadio 30 dssf + *shelf life* (Figura 4). Como los tratamientos con GA₃ y control también presentaron señal de este anticuerpo, no es posible atribuir la marca del anticuerpo al calcio aplicado durante precosecha por lo que se podría inferir que el calcio presente en la pared celular

correspondería al absorbido por la planta desde el suelo por las raíces, lo cual señalaría que las aplicaciones foliares tuvieron poco efecto.

Por otro lado, el anticuerpo LM15, que se une específicamente al motivo XXXG de la cadena de xiloglucanos de hemicelulosa, mostró mayor intensidad y patrón de marca en pinta para todos los tratamientos. Luego de este punto se pierde la señal manteniendo una baja intensidad durante cosecha y postcosecha, además no se observaron diferencias de este anticuerpo que se puedan atribuir a los tratamientos realizados (Figura 5). Este cambio en la marca durante el desarrollo de las bayas sugiere que independiente del tratamiento aplicado existió un remodelamiento de hemicelulosas, principalmente xiloglucanos, que a medida que comienza la disminución de firmeza en pinta, empiezan a modificarse junto con los homogalacturonanos de las pectinas como se vio respecto al contenido de ácidos urónicos (Figura 3). Este remodelamiento en la pared celular, a nivel de pectinas y hemicelulosas ha sido reportado durante el ablandamiento producido en la maduración de frutos, donde se sugiere que la degradación de pectinas y hemicelulosa en conjunto estarían involucradas en este proceso, donde la ruptura de las cadenas de xiloglucanos contribuyen al principio de la maduración (Wakabayashi, 2000).

Con el fin de entender que estaría ocurriendo en ambos componentes, pectinas y hemicelulosas, se realizó un fraccionamiento de pared celular de bayas de uva de mesa en todos los tratamientos. Se obtuvieron tres fracciones diferentes: pectinas solubles en agua, que corresponden principalmente a polímeros pecticos que se encuentran unidos débilmente mediante enlaces no iónicos y no covalentes; solubles en CDTA, que consisten principalmente en polímeros pecticos unidos por enlaces iónicos y solubles en Na_2CO_3 , que principalmente corresponden a pectinas unidas mediante enlaces covalentes (Christiaens *et al.*, 2011b). Además se obtuvieron dos fracciones de hemicelulosa: solubles en KOH 4%, que corresponden principalmente a glucuronoxilanos, glucomananos, y pequeñas cantidades de xiloglucanos; y hemicelulosa solubles en KOH 24%, que corresponde principalmente a hemicelulosas unidas fuertemente a la pared celular como xiloglucanos (Brummell y Harpster, 2001;

Selvendran y O'Neill, 2006). A cada fracción se le realizó la cuantificación de azúcares totales obteniendo mayor contenido el tratamiento solo con GA₃ para la fracción soluble en H₂O en todos los puntos de muestreo (Figura 6). En este caso, se pudo evidenciar que el tratamiento (GA₃) está generando un efecto que no ha sido reportado. De acuerdo a bibliografía la fracción H₂O se asocia principalmente a arabinogalactanos tipo 2 y arabinanos (Nunan *et al.*, 1998). Las fracciones pécticas solubles en CDTA y Na₂CO₃ presentaron mayor contenido de azúcares para el tratamiento con GA₃ solo en postcosecha (30 dssf + SL). Estos resultados se correlacionan con firmeza en que el punto más firme del estadio 30 dssf + SL (GA₃) es el que contiene mayor contenido de polisacáridos en pectinas que podría estar involucrado en otorgar mayor estabilidad a la pared celular durante el ablandamiento producido en el *shelf life*. Además cabe destacar que las fracciones pécticas (CDTA y Na₂CO₃) tienen mayor contenido de azúcares en el punto de pinta, que posteriormente disminuyen en cosecha y postcosecha. El mismo efecto se produjo en fracciones de hemicelulosa (KOH 4% y KOH 24%), que se correlaciona con el proceso de ablandamiento natural después de pinta durante el desarrollo de las bayas (Figura 6). Estos resultados, a su vez, correlacionan con lo mencionado anteriormente, donde el remodelamiento de la pared celular durante el ablandamiento involucra la depolimerización de ambos componentes, pectinas y hemicelulosa (Yakushiji *et al.*, 2001).

Por otra parte se realizó inmunoblots utilizando tres anticuerpos relacionados principalmente a pectinas y hemicelulosa (LM19, LM15 y LM10), con el fin de observar diferencias en la intensidad de marca de cada anticuerpo a las fracciones realizadas a residuos de pared celular (AIR) de bayas de uva de mesa. LM19 es capaz de unirse cadenas de homogalacturonanos con bloques desmetilados y bordes metilados perteneciente a las pectinas mientras que LM15 y LM10 se unen específicamente a hemicelulosas. LM15 reconoce específicamente el motivo XXXG de xiloglucanos como se mencionó anteriormente y LM10 es capaz de reconocer específicamente cadenas de xilanos no sustituidas. Con respecto a estos resultados, LM19 mostro solo diferencias significativas al momento de pinta, donde el tratamiento con GA₃ resultó tener mayor marca de este anticuerpo con respecto al control (Figura 8). Los resultados de

inmunoblots con los anticuerpos LM19, LM15 y LM10 no mostraron correlatos evidentes con la información obtenida de firmeza, por lo que las diferencias obtenidas en momentos como pinta, cosecha y postcosecha pueden ser asociadas a la técnica ya que fue principalmente cualitativa más que cuantitativa.

5.3. Análisis comparativo de expresión mediante qRT-PCR.

Mediante la selección de genes candidatos elegidos como resultado de un estudio de secuenciación masiva de RNA de muestras extraídas en un estadio cercano a cosecha de la variedad NN 107 sometida a tratamientos con GA₃, se pudo analizar la acumulación de transcritos de enzimas involucradas en el desensamble de pectinas y hemicelulosas como PG, PL, PME y XET, además de EXP. Para PG 1 se obtuvo una tendencia hacia el aumento desde pinta hasta cosecha en todos los tratamientos aplicados (Figura 9), que se correlaciona con el ablandamiento natural que se produce en la tercera etapa de desarrollo de las bayas (Figura 2). Respecto a los tratamientos, no hubo diferencias significativas con respecto al control durante desarrollo, cosecha y postcosecha. PG 2 tuvo una tendencia opuesta a PG 1 donde la expresión bajo posterior a pinta manteniéndose en bajos niveles durante cosecha y postcosecha (figura 9). Reportes de acumulación de transcritos de PG se han encontrado en uva de la variedad Shiraz, donde niveles de expresión de esta enzima son bajos durante el desarrollo sugiriendo que el desensamble de pectinas durante este periodo podría estar relacionado a la acción conjunta con PL (Nunan *et al.*, 2001). De acuerdo a estos resultados, se puede inferir que se investigó dos PGs involucradas en diferentes momentos del desarrollo de la baya siendo requerida PG1 para el ablandamiento en la tercera etapa de desarrollo mientras que PG2 más involucrada en la segunda etapa de desarrollo, cuando comienza la disminución de firmeza en pinta.

Para PL y PME se observó una tendencia de mayor acumulación de transcritos en pinta reduciéndose hacia cosecha y postcosecha (Figura 9). Estos resultados concuerdan con los observados en literatura en uva, donde análisis de ARN mensajero de estas enzimas después de pinta disminuyen a medida que llega la uva a cosecha,

asociándolo al proceso de ablandamiento natural de las bayas durante la maduración (Nunan *et al.*, 1998). Además, se observó en PL la disminución de transcritos en cosecha con aplicaciones solo de GA₃ (Figura 9). Esta situación podría explicarse por una regulación negativa por parte de GA₃ que no se ha descrito, pero existen reportes que señalan a GA₃ capaz de inducir la actividad enzimática de genes relacionados en remodelamiento de pared en etapas tempranas del desarrollo de uva relacionándose principalmente al crecimiento mediante expansión celular de las bayas (Chai *et al.*, 2014). Por lo tanto, de acuerdo los resultados obtenidos, se podría inferir que durante el desarrollo de la baya la acción de PME, PL y PG 2 es requerida al comienzo del ablandamiento. En cambio PG 1 estaría siendo estimulado por tratamientos estudiados.

Con respecto a los niveles de transcritos de XET, se observó un aumento después de pinta hasta cosecha que se mantuvo durante postcosecha (Figura 9). Este aumento de transcritos obtenidos posterior a pinta concuerda con datos ya reportados en uva *Vitis vinífera* variedad Muscat Gordo Blanco (Nunan *et al.*, 1998) donde transcritos de XET están presentes en el proceso maduración de la baya estableciendo su posible rol en las modificaciones que ocurren en la pared celular durante este periodo. Los tratamientos aplicados mostraron diferencias significativas solo en cosecha y salida de frío, donde la combinación de ambas aplicaciones (Ca + GA₃) resultó tener mayor acumulación de ARN mensajero en cosecha con respecto al control. Por otro lado a salida de frío aspersiones con solo GA₃ mostraron niveles de transcrito mayor al control (Figura 9). Estudios en uva han descrito que GA₃ es capaz de inducir la expresión de XET durante la primera etapa de desarrollo asociándolo a modificaciones de la pared celular durante el alargamiento de la baya en este periodo (Chai *et al.*, 2014). Además, en la variedad de uva de mesa Centennial Seedless, aplicaciones de GA₃ en etapas tempranas del desarrollo es capaz de regular positivamente la acumulación de transcritos de XET durante las tres etapas de desarrollo de la baya de uva (Wang *et al.*, 2012). Este aumento en la expresión de XET se relaciona fuertemente con la disminución de firmeza durante el ablandamiento de las bayas entre estas etapas. Por otro lado, este resultado, en conjunto con la inmunohistoquímica realizada con el anticuerpo LM15 (Figura 5) y la reducción del contenido de azúcares posterior a pinta

en la fracción KOH 24% (Figura 6) sugieren una degradación de la cadena de xiloglucanos, que estaría contribuyendo al ablandamiento de las bayas durante su desarrollo. Esto concuerda con lo ya reportado, donde un aumento en el nivel de transcritos de XET en bayas de uva variedad Kyoho ocurre principalmente después de pinta, relacionándolo fuertemente con el ablandamiento (Ishimaru y Kobayashi, 2002). Además, en otros frutos como tomate y arándanos los cambios a nivel de pared celular durante el ablandamiento también se producen a nivel de hemicelulosas en pared celular (Angeletti, 2010; Sakurai y Nevins, 1993).

Los cambios producidos a nivel de expresión de XET en cosecha y salida de frío no se correlacionan con el fenotipo de firmeza obtenido para el tratamiento GA₃ ya que fue el tratamiento más firme. Sin embargo, no es posible inferir alguna conclusión al respecto debido a que solo se está analizando una pequeña parte de genes asociados a remodelamiento de pared celular. Con respecto a EXP no se mostró una tendencia en todos los momentos estudiados. En uva se ha reportado que EXP está involucrada principalmente durante la primera etapa de desarrollo, donde las bayas crecen mediante división y expansión celular, pero también se han visto transcritos de este gen asociados a ablandamiento durante la maduración (Ishimaru *et al.*, 2007). En este trabajo, no es posible atribuir la expresión de esta proteína a un aumento en la expansión celular durante la tercera etapa de desarrollo ya que sus niveles de transcritos van disminuyendo a medida que llega la cosecha (Figura 9) mientras que las bayas siguen aumentando su tamaño (Figura 1). Por otro lado, en postcosecha vuelve a tener un alza en su expresión que coincide con la disminución de firmeza que se produce en el *shelf life* sugiriendo la participación de EXP en el ablandamiento durante este periodo.

6. Conclusiones y Proyecciones.

En este trabajo se realizó un estudio comparativo fisiológico y molecular durante el desarrollo, cosecha y postcosecha de bayas de uva de mesa variedad Thompson Seedless sometidos a aplicaciones mediante aspersión de calcio y ácido giberélico, con el fin de encontrar diferencias relacionadas al parámetro de firmeza de baya.

En base a la información obtenida, se estableció que el tratamiento de calcio no produjo efecto significativo en firmeza, mientras que la aplicación de ácido giberélico logró aumentar la firmeza de las bayas al momento de cosecha y durante el almacenamiento en frío.

Con respecto a los análisis de composición de pared celular, el ablandamiento producido desde pinta hasta cosecha se correlacionó principalmente con la remodelación de pectinas (ácidos urónicos) y hemicelulosa (xiloglucano), independiente del tratamiento aplicado. Durante cosecha y postcosecha, la mantención de firmeza asociada al tratamiento con ácido giberélico no presentó una correlación con los cambios asociados a pared celular.

La acumulación de transcritos de PG 1, PG 2, PME y PL durante precosecha se relacionaron con la disminución del contenido de ácidos urónicos y azúcares totales en fracciones pécticas. Por otro lado, el aumento de expresión de XET posterior a pinta se correlacionó inversamente con el contenido de azúcares totales. Estos resultados sugieren un desensamble de pectinas y hemicelulosas por acción conjunta de estas enzimas durante la tercera etapa de desarrollo de las bayas correlacionándose con la disminución en firmeza desde pinta a cosecha.

De acuerdo a este estudio, los experimentos realizados no contribuyeron a obtener evidencias claras sobre el efecto en firmeza de aspersiones de calcio. Por otro lado, la mayor firmeza obtenida con aplicaciones de ácido giberélico fue independiente de los cambios asociados a remodelamiento de pared estudiados, lo cual sugiere que otros

factores están involucrados. De esta manera se sugiere seguir investigando el efecto sobre la firmeza de baya y remodelamiento de pared asociado a aplicaciones en campo de calcio en conjunto con GA3.

7. Referencias.

Al-Obeed, R. S. (2011). Enhancing the shelf life and storage ability of flame seedless grapevine by agrochemical preharvest foliar applications. *Middle East Journal of Scientific Research* 8(2): 319-327.

Angeletti, P., Castagnasso, H., Miceli, E., Terminiello, L., Concellón, A., Chaves, A., & Vicente, A. R. (2010). Effect of preharvest calcium applications on postharvest quality, softening and cell wall degradation of two blueberry (*Vaccinium corymbosum*) varieties. *Postharvest Biology and Technology*, 58(2): 98-103.

Balic, I., Ejsmentewicz, T., Sanhueza, D., Silva, C., Peredo, T., Olmedo, P., Barros, M., Verdonk, J., Paredes, R., Meneses, C., Prieto, H., Orellana, A., Defilippi, B., Campos-Vargas, R. (2014). Biochemical and physiological study of the firmness of table grape berries. *Postharvest Biology and Technology* 93: 15-23.

Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., Pellerin, P., 2001. Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. *Phytochemistry* 58: 693–701.

Ben-Arie, R., Sarig, P., Cohen-Ahdut, Y., Zutkhi, Y., Sonogo, L., Kapulonov, T., & Lisker, N. (1997). CPPU and GA3 effects on pre-and post-harvest quality of seedless and seeded grapes. In *VIII International Symposium on Plant Bioregulation in Fruit Production* 463 (pp. 349-358).

Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54: 484-489.

Bonghi, C., Begheldo, M., Ziliotto, F., Rasori, A., Trainotti, L., Tadiello, A., Tonutti, P. (2009). Transcriptome analyses and postharvest physiology of peaches and nectarines. In VI International Postharvest Symposium 877: 69-73.

Bonomelli, C., Ruiz, R. (2010). Effects of foliar and soil calcium application on yield and quality of table grape cv. 'Thompson seedless'. *Journal of Plant Nutrition*, 33(3): 299-314.

Braccini, I., Grasso, R. P., Pérez, S. (1999). Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. *Carbohydrate Research*, 317(1): 119-130.

Brummell, D. A., Harpster, M. H. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47: 311–340.

Brühlmann, F. (1995). Purification and characterization of an extracellular pectate lyase from an *Amycolata* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10): 3580-3585.

Cabanne, C., & Donèche, B. (2001). Changes in polygalacturonase activity and calcium content during ripening of grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(4): 331-335.

Cárdenas-Coronel, W. G., Velez-de la Rocha, R., Siller-Cepeda, J. H., Osuna-Enciso, T., Muy-Rangel, M. D., & Sañudo-Barajas, J. A. (2012). Changes in the composition of starch, pectin and hemicellulose during ripening of mango (*Mangifera indica* cv. Kent). *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 18(1): 5-19.

Chai, L., Li, Y., Chen, S., Perl, A., Zhao, F., & Ma, H. (2014). RNA sequencing reveals high resolution expression change of major plant hormone pathway genes after young seedless grape berries treated with gibberellin. *Plant Science*, 229: 215-224.

Christiaens, S., Van Buggenhout, S., Ngouémazong, E.D., Vandevenne, E., Fraeye, I., Duvetter, T., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E. (2011a). Anti-homogalacturonan antibodies: A way to explore the effect of processing on pectin in fruits and vegetables? *Food Research International* 44: 225-234.

Christiaens, S., Van Buggenhout, S., Houben, K., Fraeye, I., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2011b). Towards a better understanding of the pectin structure–function relationship in broccoli during processing: Part I—macroscopic and molecular analyses. *Food Research International*, 44(6): 1604-1612.

Ciccarese, A., Stellacci, A. M., Gentile, G., Rubino, P. (2013). Effectiveness of pre- and post-veraison calcium applications to control decay and maintain table grape fruit quality during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 75: 135-141.

Coombe, B. G., & Hale, C. R. (1973). The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiology*, 51(4): 629-634.

Coombe, B. G., & McCarthy, M. G. (2000). Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2): 131-135.

Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802): 321-326.

Dal Santo, S., Vannozzi, A., Toriello, G. B., Fasoli, M., Venturini, L., Pezzotti, M., & Zenoni, S. (2013). Genome-wide analysis of the expansin gene superfamily reveals grapevine-specific structural and functional characteristics. *PLoS One*, 8(4): e62206.

Deluc, L.G., Grimplet, J., Wheatley, M.D., Tillett, R.L., Quilici, D.R., Osborne, C., Schooley, D. a, Schlauch, K. a, Cushman, J.C., Cramer, G.R., 2007. Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics* 8(1): 429.

Deytieu-Belleau, C., Vallet, A., Donèche, B., Geny, L., 2008. Pectin methylesterase and polygalacturonase in the developing grape skin. *Plant Physiology Biochemistry*, 46: 638–646.

Dokoozlian, N. K. (2000a). Grape berry growth and development. *Raisin Production Manual*, 3393: 30-37.

Dokoozlian, N. (2000b). Plant growth regulator use for table grape production in California. In *Proceedings of 4th International Symposium on Table Grape*, 28: 129-143.

Dreywood, R. (1946). Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 18(8): 499-499.

Du Plessis, B. W. (2008). Cellular factors that affect table grape berry firmness. Thesis of Master of AgriSciences at Stellenbosch University.

Filisetti-Cozzi, T.M.C.C., Carpita, N.C., (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197: 157–162.

Fournand, D., Vicens, A., Sidhoum, L., Souquet, J. M., Moutounet, M., Cheynier, V. (2006). Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19): 7331-7338.

Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters*, 32(1): 195-198.

Gudenschwager, O., González-Agüero, M., Defilippi, B. G. (2012). A general method for high-quality RNA isolation from metabolite-rich fruits. *South African Journal of Botany* 83: 186-192.

Harris, J. M., Kriedemann, P. E., & Possingham, J. V. (1968). Anatomical aspects of grape berry development. *Vitis*, 7(2): 106-119.

Ishimaru, M., Kobayashi, S. (2002). Expression of a xyloglucan endo-transglycosylase gene is closely related to grape berry softening. *Plant Science*. 162(4): 621-628.

Ishimaru, M., Smith, D. L., Gross, K. C., & Kobayashi, S. (2007). Expression of three expansin genes during development and maturation of Kyoho grape berries. *Journal of Plant Physiology*. 164(12): 1675-1682.

Lara, I. (2013). Preharvest sprays and their effects on the postharvest quality of fruit. *Stewart Postharvest Review*. 9(3): 1-12.

- Lefever, G., Vieuille, M., Delage, N., Monteclerc, J., Bompeix, G. (2004). Characterization of cell wall enzyme activities, pectin composition, and technological criteria of strawberry cultivars (*Fragaria X ananassa* Duch). *Journal of Food Science*, 69(4): 221-226.
- Liners, F., Letesson, J. J., Didembourg, C., & Van Cutsem, P. (1989). Monoclonal antibodies against pectin recognition of a conformation induced by calcium. *Plant Physiology*, 91(4): 1419-1424.
- Lund, S. T., Peng, F. Y., Nayar, T., Reid, K. E., & Schlosser, J. (2008). Gene expression analyses in individual grape (*Vitis vinifera* L.) berries during ripening initiation reveal that pigmentation intensity is a valid indicator of developmental staging within the cluster. *Plant Molecular Biology*, 68(3): 301-315.
- Marín-Rodríguez, M. C., Orchard, J., & Seymour, G. B. (2002). Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, 53(377): 2115-2119.
- Marcus, S. E., Verhertbruggen, Y., Hervé, C., Ordaz-Ortiz, J. J., Farkas, V., Pedersen, H. L. & Knox, J. P. (2008). Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biology*, 8(1): 60.
- Marzouk, H. A., Kassem, H. A. (2011). Improving yield, quality, and shelf life of Thompson seedless grapevine by preharvest foliar applications. *Scientia Horticulturae*, 130(2): 425-430.
- McCartney, L., Marcus, S. E., Knox, J. P. (2005). Monoclonal antibodies to plant cell wall xylans and arabinoxylans. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 53(4): 543-546.
- Nunan, K. J., Sims, I. M., Bacic, A., Robinson, S. P., & Fincher, G. B. (1998). Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiology*, 118(3): 783-792.
- Nunan, K.J., Davies, C., Robinson, S.P., Fincher, G.B., 2001. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta* 214: 257–264.

Nuovo, G.J., 1992. PCR in situ hybridization. In: Protocols and Applications. Raven Press, New York, p. 88.

Odonoghue, E. M., Huber, D. J. (1992). Modification of matrix polysaccharides during avocado (*Persea americana*) fruit ripening: an assessment of the role of Cx-cellulase. *Physiologia Plantarum*, 86(1): 33-42.

Pfaffl, M.W., (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9): e45-e45.

Redgwell, R. J., Melton, L. D., Brasch, D. J. (1988). Cell-wall polysaccharides of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*): chemical features in different tissue zones of the fruit at harvest. *Carbohydrate Research*, 182(2): 241-258.

Retamales, J., Bangerth, F., Cooper, T., & Callejas, R. (1994). Effects of CPPU and GA3 on fruit quality of Sultanina table grape. *Plant Bioregulators in Horticulture* 394: 149-158.

Rolle, L., Río Segade, S., Torchio, F., Giacosa, S., Cagnasso, E., Marengo, F., Gerbi, V. (2011). Influence of grape density and harvest date on changes in phenolic composition, phenol extractability indices, and instrumental texture properties during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(16): 8796-8805.

Rose, J. K., Bennett, A. B. (1999). Cooperative disassembly of the cellulose–xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Science*, 4(5): 176-183.

Sakurai, N., & Nevins, D. J. (1993). Changes in physical properties and cell wall polysaccharides of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pericarp tissues. *Physiologia Plantarum*, 89(4): 681-686.

Saulnier, L., & Thibault, J. F. (1987). Extraction and characterization of pectic substances from pulp of grape berries. *Carbohydrate Polymers*, 7(5): 329-343.

Selvendran, R. R., & O'Neill, M. A. (2006). Isolation and analysis of cell walls from plant material. *Methods of Biochemical Analysis*, 32: 25-153.

Singh, K., Weaver, R.J., Johnson, J.O., 1978. Effect of applications of gibberellic acid on berry size, shatter, and texture of Thompson Seedless grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 29(4): 258-262.

Sun, X., Yang, Q., Guo, W., Dai, L., Chen, W. (2013). Modification of cell wall polysaccharide during ripening of Chinese bayberry fruit. *Scientia Horticulturae*, 160: 155-162.

Thomas, S. G., Rieu, I., Steber, C. M. (2005). Gibberellin metabolism and signaling. *Vitamins and Hormones*, 72: 289-338.

Vargas, A. M., Fajardo, C., Borrego, J., De Andrés, M. T., & Ibáñez, J. (2013). Polymorphisms in VvPel associate with variation in berry texture and bunch size in the grapevine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19(2): 193-207.

Verherbruggen, Y., Marcus, S. E., Haeger, A., Ordaz-Ortiz, J. J., Knox, J. P. (2009). An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydrate Research*, 344(14): 1858-1862.

Vicente, A. R., Ortugno, C., Powell, A. L., Greve, L. C., Labavitch, J. M. (2007a). Temporal sequence of cell wall disassembly events in developing fruits. 1. Analysis of raspberry (*Rubus idaeus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10): 4119-4124.

Vicente, A. R., Ortugno, C., Rosli, H., Powell, A. L., Greve, L. C., Labavitch, J. M. (2007b). Temporal sequence of cell wall disassembly events in developing fruits. 2. Analysis of blueberry (*Vaccinium* species). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10): 4125-4130.

Vidal, S., Williams, P., O'Neill, M. A., & Pellerin, P. (2001). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 45(4): 315-323.

Wakabayashi, K. (2000). Changes in cell wall polysaccharides during fruit ripening. *Journal of Plant Research*, 113(3): 231-237.

Wang, Z., Zhao, F., Zhao, X., Ge, H., Chai, L., Chen, S. & Ma, H. (2012). Proteomic analysis of berry-sizing effect of GA3 on seedless *Vitis vinifera* L. *Proteomics*, 12(1): 86-94.

White, P. J., Broadley, M. R. (2003). Calcium in plants. *Annals of Botany*, 92(4): 487-511.

Yakushiji, H., Sakurai, N., Morinaga, K. (2001). Changes in cell-wall polysaccharides from the mesocarp of grape berries during veraison. *Physiologia Plantarum*, 111(2): 188-195.

Zenoni, S., Ferrarini, A., Giacomelli, E., Xumerle, L., Fasoli, M., Malerba, G. & Delledonne, M. (2010). Characterization of transcriptional complexity during berry development in *Vitis vinifera* using RNA-Seq. *Plant physiology*, 152(4): 1787-1795.

Zoffoli, J. P., Latorre, B. A., Naranjo, P. (2009). Preharvest applications of growth regulators and their effect on postharvest quality of table grapes during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 51(2): 183-192.

8. Anexo.

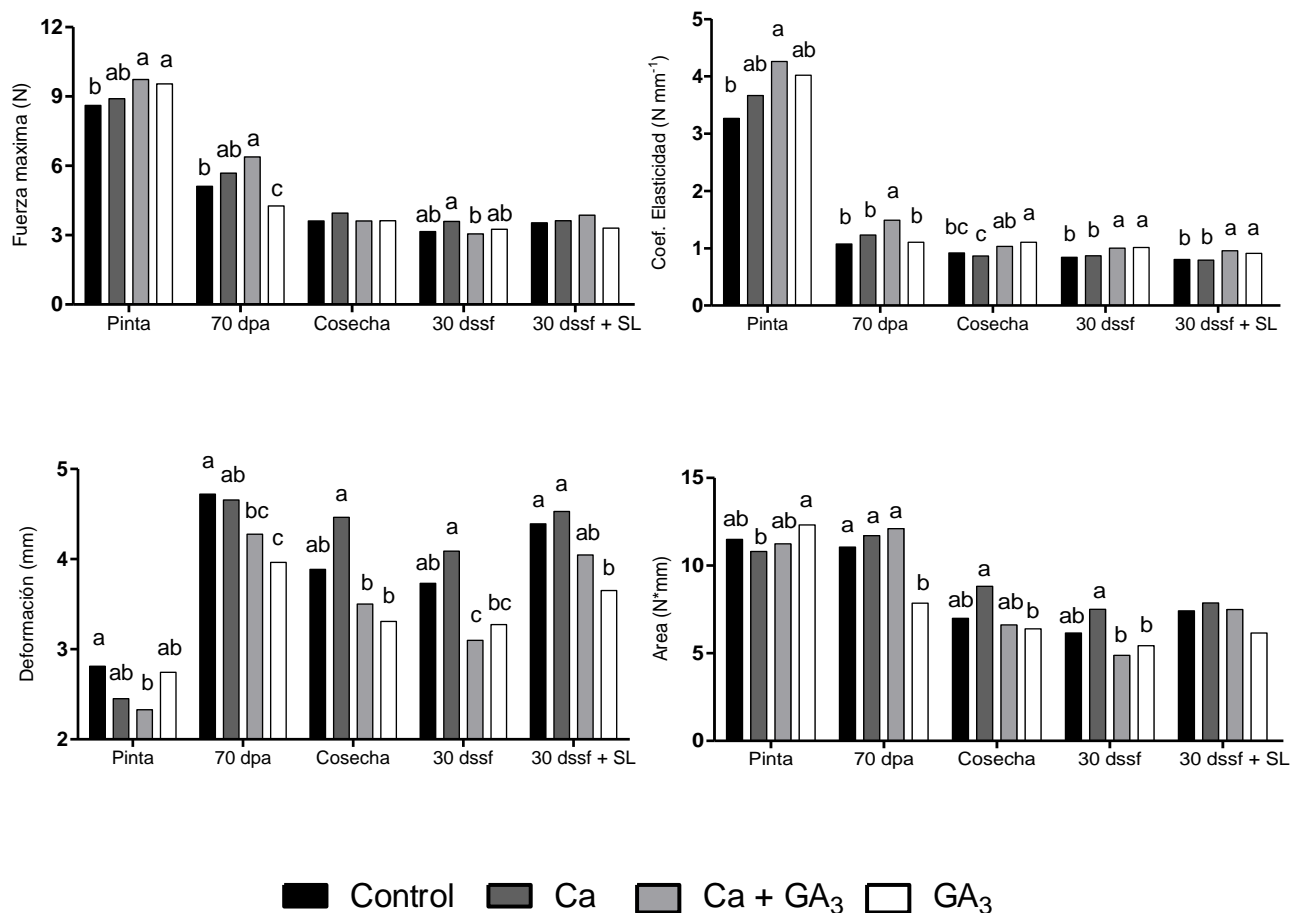


Figura S1. Firmeza de baya total expresada como fuerza máxima, coeficiente de elasticidad, deformación y trabajo. Cambios en firmeza de bayas de uva de mesa variedad Thompson Seedless para los cuatro tratamientos estudiados ordenados desde pinta hasta cosecha, 30 días a 0°C (30 dssf) y 30 días a 0°C mas *shelf life* (30 dssf + SL). Las letras simbolizan las diferencias estadísticas para cada tratamiento en un punto de muestreo, utilizando ANOVA y la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Ausencia de letras indican que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.